

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA**



**Corso di Dottorato in Scienze Cliniche e
Farmaco-tossicologiche Veterinarie
XXIV Ciclo**

Tesi di dottorato in Clinica Ostetrica

**“Ruolo della SOD (*SuperOxide Dismutasi*) nella
prevenzione dello stress ossidativo in gameti di
differenti specie animali.”**

Relatore
Prof.ssa Natascia Cocchia

Candidato
Dr Isabella Rosapane

INDICE

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE	pag. 5
1.1 LE ART IN MEDICINA VETERINARIA	pag. 5
1.2 LO STRESS OSSIDATIVO	pag. 6
1.2.1 Stress ossidativo e gameti	pag. 9
1.2.2 Stress ossidativo e antiossidanti	pag. 10
1.3 RUOLO FISIOLÓGICO DEI ROS NEL SISTEMA RIPRODUTTIVO	pag. 15
1.3.1 Ros e spermatozoi	pag. 18
1.3.2 Ros e oociti	pag. 20
1.4 STRESS OSSIDATIVO E INFERTILITA'	pag. 21
1.4.1 Ros e infertilita' nell'uomo	pag. 21
1.4.2 Ros e infertilita' negli animali	pag. 22
1.4.3 Ros ed infertilita' nel cane	pag. 27
1.4.4 Ros ed infertilita' nel cavallo	pag. 30
1.4.5 Ros ed infertilita' nei felini	pag. 34
1.5 OBIETTIV DELLLO STUDIO	pag. 35
CAPITOLO 2 – MATERIALI E METODI	pag. 36
2.1 FASE SPERIMENTALE 1-PARTE I	pag. 36
2.1.1 Animali	pag. 36
2.1.2 Raccolta del seme	pag. 37
2.1.3 Test di motilità e vitalità	pag. 37
2.1.4 Valutazione dello stato acrosomiale	pag. 38
2.1.5 Analisi western blot	pag. 39
2.1.6 Analisi statistica	pag. 41

2.2 FASE SPERIMENTALE 1- PARTE II	pag. 41
2.2.1 Animali	pag. 41
2.2.2 Piano sperimentale	pag. 41
2.2.3 Raccolta del seme	pag. 42
2.2.4 Test di motilità e vitalità	pag. 42
2.2.5 Valutazione della frammentazione del dna	pag. 42
2.3 FASE SPERIMENTALE 2	pag. 44
2.3.1 Animali	pag. 44
2.3.2 Piano sperimentale	pag. 44
2.3.3 Test di motilità e vitalità	pag. 45
2.3.4 Analisi statistica	pag. 45
2.4 FASE SPERIMENTALE 3	pag. 46
2.4.1 Animali	pag. 46
2.4.2 Piano sperimentale	pag. 46
2.4.3 Raccolta oociti	pag. 47
2.4.4 Raccolta del seme, IVM, IVF, IVC	pag. 47
2.4.5 Immunoistochimica	pag. 49
2.4.6 Analisi PCR	pag. 49
2.4.7 Analisi statistica	pag. 49
CAPITOLO 3 – RISULTATI	pag. 50
3.1.1 FASE SPERIMENTALE 1-PARTE I	pag. 50
3.1.2 FASE SPERIMENTALE 1- PARTE II	pag. 54
3.2 FASE SPERIMENTALE 2	pag. 57
3.3 FASE SPERIMENTALE 3	pag. 58
3.3.1 Test funzionale	pag. 58

3.3.2 Test immunoistochmico	pag. 60
3.3.3 Test molecolare	pag. 62
CAPITOLO 4 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag. 63
4.1.1 FASE SPERIMENTALE 1-PARTE I	pag. 63
4.1.2 FASE SPERIMENTALE 1-PARTE 2	pag. 64
4.2 FASE SPERIMENTALE 2	pag. 65
4.3 FASE SPERIMENTALE 3	pag. 66
4.4 CONCLUSIONI GENERALI	pag. 67
CAPITOLO 5 – BIBLIOGRAFIA	pag 68

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

1.1 LE ART IN MEDICINA VETERINARIA

Negli ultimi anni sono state sviluppate tecnologie di riproduzione assistita (ART) e ciò ha permesso clamorose innovazioni nei processi riproduttivi tanto nell'uomo quanto negli animali (Galli et al., 2007); peraltro, i vantaggi tratti in Medicina Veterinaria da tali progressi hanno riguardato sia il bestiame da reddito (Blondin P et al., 2002) che la salvaguardia delle specie selvatiche minacciate di estinzione grazie al recupero e al potenziamento delle possibilità di moltiplicazione di materiale genetico spesso di inestimabile valore (Howard JG et al., 2003; Shelton M, 1995).

Le ART comprendono l'inseminazione artificiale, la sincronizzazione e l'induzione degli estri, la sincronizzazione e l'induzione dei parti (Shelton et al., 1995), nonché tutte le procedure eseguite sui gameti o sugli embrioni come raccolta e conservazione del materiale seminale (refrigerazione e congelamento/scongelo), raccolta degli oociti e maturazione in vivo e/o in vitro (IVM), fecondazione in vitro (IVF), iniezione spermatozoaria intracitoplasmatica (ICSI), produzione (IVP), coltivazione (IVC) e conservazione di embrioni, trasferimento embrionale (ET) (Swanson WF et al., 2007).

Il processo di fecondazione, così come avviene nell'ovidutto, è un meccanismo molto complesso legato all'interazione tra i gameti maschile e femminile per ricostituire la diploidia dello zigote (Galli et al., 2007); il termine "fecondazione in vitro" indica il processo di anfigamisi che avviene al di fuori del corpo della madre, mentre per "produzione embrionale in vitro" si intendono tutti i metodi per produrre embrioni esclusivamente in vitro attraverso tecniche di maturazione oocitaria (IVM), IVF e iniezione spermatica intracitoplasmatica (ICSI) (Bó et al., 2003). Tali metodiche come accennato prevedono la raccolta dei gameti ed il loro stoccaggio e pertanto rappresentano procedure fondamentali per il futuro utilizzo di tali cellule e per la salvaguardia del patrimonio genetico in esse

contenuto(Leibo et al., 1993); negli anni si sono succedute tantissime ricerche miranti al miglioramento sia delle metodiche che dei mezzi usati per la conservazione del seme e degli oociti e tantissime soluzioni sono state descritte per limitare quanto più possibile gli effetti nocivi di agenti come il freddo o le variazioni di concentrazione osmotica e di O₂ a cui sono sottoposti i gameti nel corso di queste operazioni . In realtà è ormai comprovato che tutte le strutture biologiche, comprese le cellule sessuali, quando sottoposte a crioconservazione e/o refrigerazione, accanto ai tanto discussi effetti nocivi osmotici, termici e chimici subiscono l'effetto di una ulteriore importante condizione di stress: quello ossidativo.

1.2 LO STRESS OSSIDATIVO

Con la comparsa dell'ossigeno atmosferico sulla terra, diversi organismi hanno sviluppato meccanismi in grado di utilizzare questo gas per i processi metabolici; nello stesso tempo si sono evoluti sistemi di difesa per tollerare i radicali tossici prodotti dall'incompleta riduzione dell'ossigeno ad acqua (Hassan HM et al., 1978). Questa reazione infatti procede attraverso stadi di riduzione univalente con produzione di specie che hanno un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno; tali specie sono pertanto molto reattive e vengono denominate ROS (Reactive Oxygen Species).

E' ben stabilito che un'importante minaccia all'omeostasi degli organismi aerobi deriva da specie chimiche denominate radicali liberi, molecole caratterizzate dalla presenza di uno o più elettroni spaiati nell'orbitale esterno e sono normalmente contraddistinte da un'elevata reattività. La loro esistenza fu comprovata sperimentalmente per la prima volta da Gomberg (1900), il quale riuscì ad ottenere il radicale trifenilmetile, (C₆H₅)C₃. Tuttavia, solo dopo molto tempo fu proposto che i radicali dell'ossigeno e altre specie reattive potevano formarsi negli organismi viventi come sottoprodotto del normale metabolismo aerobico.

I radicali liberi si formano costantemente all'interno dell'organismo. La catena di trasporto elettronico mitocondriale è sicuramente la sorgente produttiva di ROS più importante.

Oltre alle fonti esterne, i ROS sono prodotti all'interno delle cellule in diversi tipi di tessuti; la maggior parte delle specie reattive dell'ossigeno sono prodotte dai mitocondri

(Figura 1).

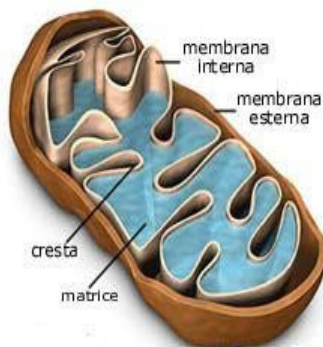


Figura 1: I mitocondri rappresentano la principale fonte endogena di produzione di ROS.

In questi organelli, durante la fosforilazione ossidativa, la quasi totalità dell'ossigeno è completamente ridotta a molecola di acqua dall'enzima citocromo ossidasi, utilizzando gli elettroni derivanti dai coenzimi piridinici ridotti (NADH e FADH₂) attraverso i complessi enzimatici della catena di trasporto elettronico mitocondriale. Tuttavia alcuni trasportatori elettronici situati nel complesso respiratorio I e III, sono in grado di cedere un elettrone all'ossigeno formando l'anione superossido e non essendo capace di trattenerlo, lo rilasciano nel mezzo circostante, al contrario della COX, che trattiene tutte le forme parzialmente ridotte dell'O₂ fino alla sua completa riduzione. Nella matrice mitocondriale è presente l'enzima SuperOssido Dismutasi Mn-dipendente (MnSOD) che converte rapidamente l'anione superossido in H₂O₂. Alcuni studi indicano che nei mitocondri è prodotto anche il radicale idrossilico (Nohl et al., 1981). Nel nostro organismo esiste un delicato equilibrio fra produzione ed eliminazione di radicali liberi ed altre specie reattive

all'ossigeno. I radicali liberi sono atomi o raggruppamenti di atomi aventi in uno degli orbitali esterni delle specie chimiche che li costituiscono almeno un elettrone spaiato. Tali agenti giocano un ruolo essenziale nei sistemi viventi, sia contribuendo alla difesa contro l'aggressione di patogeni sia intervenendo nella modulazione di importanti processi biologici (es. espressione genica, trasduzione di segnali biochimici, etc.). Essi, tuttavia, sono potenzialmente nocivi, poiché tendendo ad acquisire l'elettrone ad essi mancante per raggiungere la propria stabilità, possono virtualmente reagire con qualsiasi molecola con la quale vengono a contatto, ossidandola.

Lo stress ossidativo è implicato nell'eziopatogenesi di diverse malattie dell'uomo come l'aterosclerosi, il cancro, il diabete, alcune epatopatie, l'artrite reumatoide, la cataratta, l'AIDS, la malattia infiammatoria intestinale, parecchi disturbi del sistema nervoso centrale, il morbo di Parkinson, quasi tutte le condizioni associate a nascite premature nonché nei processi di invecchiamento cellulare (Agarwal A, 2005). Fra i targets biologici dello stress ossidativo, i lipidi di membrana sono la classe di biomolecole maggiormente colpite (Del Rio et al., 2005). Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) hanno un ruolo fondamentale nella mediazione del danno tissutale poiché l'ossigeno, oltre ad essere indispensabile alla vita, è anche tossico. Tra i più importanti ROS (Halliwell, 1996) ricordiamo:

- $\text{HO}\cdot$, radicale idrossile
- O_2^- , anione superossido
- H_2O_2 , perossido di idrogeno
- $^1\text{O}_2$, ossigeno singoletto.

Queste molecole sono in grado di innescare la perossidazione dei lipidi biologici, processo che può essere implicato in diverse patologie (Tribble, 1999).

L'attacco da parte dei radicali liberi ($\text{R}\cdot$) agli acidi grassi polinsaturi presenti nelle membrane biologiche determina l'avvio del processo di perossidazione lipidica, una cascata di eventi che esitano nel deterioramento O_2 -dipendente (figura 2) che porta alla

compromissione dell'integrità delle membrane biologiche (Halliwell and Gutteridge, 1984). I radicali liberi reagiscono con numerose molecole biologiche, quali lipidi, proteine e DNA presenti in una cellula, provocando variazioni ossidative e alterandone, di conseguenza, la struttura e la funzione. Il principale bersaglio dei ROS è rappresentato dalla componente fosfolipidica delle biomembrane e delle lipoproteine plasmatiche (Halliwell et al., 1990; Kowaltowski et al., 1999). A essere attaccati sono principalmente gli acidi grassi polinsaturi (PUFAs), i quali subiscono un processo a catena, noto come perossidazione lipidica, che comporta la loro trasformazione in idroperossidi lipidici (LOOH) e composti aldeidici secondari, come la malondialdeide (MDA) (Gutteridge, 1995) ed il 4-idrossinonale (4-HNE). La perossidazione lipidica può essere innescata da una qualsiasi sostanza capace di estrarre un atomo di idrogeno da un gruppo metilenico reattivo di un PUFA, tra cui i radicali ossidrilici, alcossilici, perossilici ed alchilici (Figura 2).

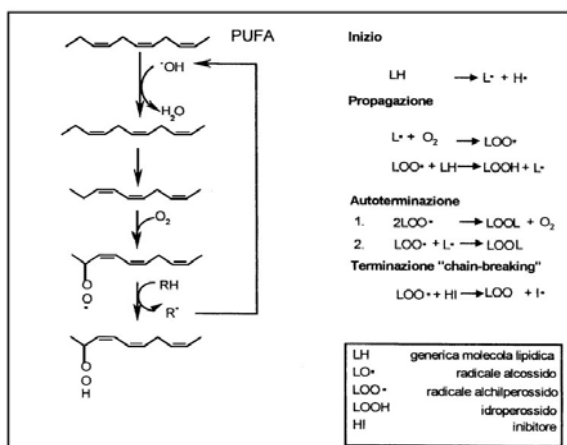


Figura 2. Sequenza di reazioni della perossidazione lipidica.

1.2.1 STRESS OSSIDATIVO E GAMETI

Le cause di un aumento dei radicali liberi possono essere esterne e interne all'organismo. Tra le esterne, sono da annoverare alcuni agenti fisici (es. le radiazioni ultraviolette e ionizzanti), numerose sostanze chimiche (es. idrocarburi, diserbanti, contaminanti

alimentari, farmaci) e taluni patogeni (es. virus e batteri). Tra le interne all'organismo sono da citare l'accelerazione esagerata del metabolismo cellulare. In tal senso, risulta ovvio il richiamo alla cellula che per antonomasia svolge in un lasso di tempo relativamente breve uno sforzo metabolico di clamorosa intensità come avviene per lo spermatozoo nel periodo che va dalla eiaculazione fino alla risalita nelle vie genitali femminili; se a ciò poi aggiungiamo lo stress conseguente ai processi di conservazione del materiale seminale in corso di refrigerazione o congelamento risalta all'attenzione dei più come tali unità siano le principali indiziate a subire i danni di cui abbiamo accennato in precedenza.

1.2.2 STRESS OSSIDATIVO E ANTIOSSIDANTI

Paradossalmente proprio l'ossigeno - indispensabile per mantenerci in vita - è anche la più importante fonte di produzione di radicali liberi. Questi sono infatti composti da ossigeno (lo stesso che respiriamo), che si lega ad altri elementi presenti nel nostro corpo dando vita a particolari molecole, che reagiscono con le diverse strutture dell'organismo. Quando l'equilibrio fisiologico fra produzione ed eliminazione di radicali liberi si altera a favore delle specie reattive, queste ultime, accumulandosi, provocano una serie di lesioni cellulari che, se non adeguatamente circoscritte, possono evolvere in danno d'organo o sistemico, disegnando, così, il quadro del cosiddetto "stress ossidativo". Lo stress ossidativo è una forma di "stress chimico" indotto dalla presenza, nel nostro organismo, di quantità esageratamente elevate di ROS e, in particolare, di radicali liberi. Tale condizione può essere la conseguenza di un'aumentata produzione di ROS e/o di una ridotta efficienza dei sistemi di difesa antiossidanti, normalmente deputati al loro "smaltimento".

Gli organismi viventi hanno perciò sviluppato complessi sistemi di antiossidanti per contrastare l'azione di queste molecole, che risultano essere dannose per l'organismo (Prior and Cao, 1999); tra questi ricordiamo i sistemi enzimatici SuperOssido Dismutasi, le Catalasi e la Glutathione Perossidasi, così come quelli non-enzimatici come gli antiossidanti

idrosolubili glutazione e acido ascorbico (Vitamina C), e liposolubili α -tocoferolo (Vitamina E) e β -carotene (Vitamina A) (Therond et al., 2000).

L'organismo, nel corso dell'evoluzione, ha sviluppato meccanismi biochimici per la difesa dei tessuti e delle cellule contro i danni da radicali liberi; in particolare i mitocondri possiedono sistemi di difesa antiossidante molto efficienti. Questi complessi sistemi di difesa sono in grado di agire a diversi livelli: prevenendo la formazione di ROS, intercettando i ROS una volta formati, oppure riparando il danno ossidativo (Figura 3). Un antiossidante è una qualsiasi sostanza che, presente a basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato ossidabile, ritarda o inibisce significativamente l'ossidazione di tale substrato (Halliwell e Gutteridge, 1990).

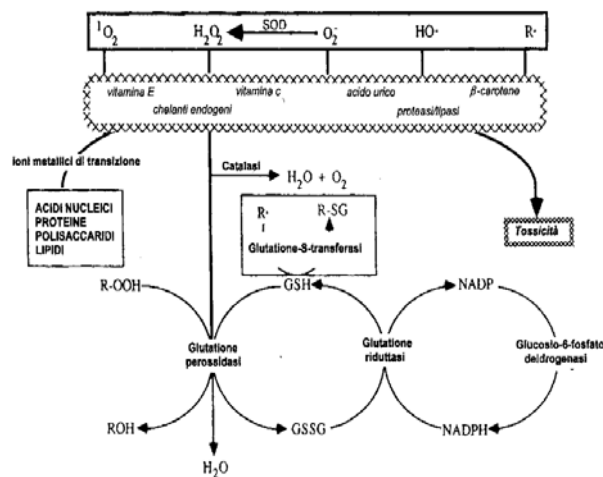


Figura 3: Sistema di difesa antiossidante.

Le strategie di difesa utilizzate contro i radicali liberi da differenti tessuti sono alquanto diverse. Esse dipendono dal tipo cellulare e dallo stato fisiologico e presumibilmente riflettono esigenze nelle funzioni biologiche. In ogni caso i meccanismi di difesa

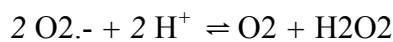
consistono essenzialmente da sistemi di enzimi antiossidanti e sostanze antiossidanti a basso peso molecolare, detti “ free radical scavengers” (Yu and Quinn, 1994).

Fra gli enzimi antiossidanti si annoverano:

- Catalasi (CAT) che decompone H_2O_2 in acqua e ossigeno. Tale enzima mostra elevata attività nel fegato, nel rene e negli eritrociti e nei mitocondri di cuore; è localizzato in piccole particelle subcellulari denominate perossisomi. L'attività enzimatica della CAT aumenta in concomitanza all'aumento della produzione del perossido di idrogeno.
- Glutatione perossidasi (GPX) rimuove l' H_2O_2 , formatosi dalla dismutazione del superossido, utilizzandolo come substrato per ossidare il glutatione. L'enzima GPX è ampiamente distribuito nei tessuti animali, ma è principalmente presente nel citosol, mentre la matrice mitocondriale contiene circa il 10% del totale. La capacità dei sistemi che utilizzano il glutatione per rimuovere l' H_2O_2 dipende dall'attività della GPX e dalla concentrazione del GSH; quindi per assicurare la massima efficienza del sistema in ogni momento della vita cellulare, il glutatione ossidato, derivante dalla riduzione del GSH ad opera della GPX, deve essere ridotto a sua volta a mezzo dell'intervento catalitico dell'enzima antiossidante glutatione reduttasi (GR) a spese del NADPH, prodotto nel ciclo dei pentosi-fosfato. L'enzima GR mantiene il rapporto GSH/GSSG a un livello relativamente alto (> 10:1).
- SuperOssido Dismutasi (SOD) che catalizza la conversione del superossido in H_2O_2 . Esistono due tipi di SOD: una Mn-dipendente, localizzata nei mitocondri

dove interagisce con il superossido derivato dalla catena di trasferimento elettronico. L'altra, Cu e Zn-dipendente, è localizzata nel citosol cellulare, dove svolge una funzione catalitica più generica. Affinchè la protezione da parte della SOD sia valida, è necessario che l' H_2O_2 sia immediatamente convertito in H_2O , impedendo in questo modo che l'intervento dei complessi degli ioni metallici lo trasformi nel radicale idrossilico altamente tossico.

L'enzima superOssido Dismutasi (SOD), che appartiene alla classe delle ossidoreduttasi, catalizza la seguente reazione:



Esistono molte forme comuni di SOD: sono proteine cofattorate con rame e zinco, o manganese, ferro, o nichel.

- I citosol di praticamente tutte le cellule eucariote contengono enzima SOD con rame e zinco (Cu-Zn-SOD). (Per esempio, Cu-Zn-SOD disponibile in commercio è normalmente purificata dagli eritrociti bovini: PDB 1SXA, EC 1.15.1.1). L'enzima Cu-Zn è un omodimero di peso molecolare 32,500. Le due subunità sono unite innanzitutto grazie a interazioni idrofobiche ed elettrostatiche. I legami di rame e zinco sono catene laterali all'istidina.
- I mitocondri del fegato dei polli (e quasi tutti gli altri), e molti batteri (come l' E. coli) contengono una forma con manganese (Mn-SOD). (Per esempio, la Mn-SOD trovata in un mitocondrio umano: PDB 1N0J, EC 1.15.1.1). I legami degli ioni manganese sono 3 catene laterali all'istidina, una catena laterale all'aspartato e una molecola d'acqua o legame o legame ossidrile a seconda dello stato di ossidazione del Mn (rispettivamente II e III).

Nell'uomo, sono presenti tre forme di superossido dismutasi. La SOD₁ si trova nel citoplasma, la SOD₂ nei mitocondri mentre la SOD₃ è extracellulare.

La superossido dismutasi (SOD) è un enzima ubiquitario, che svolge un ruolo chiave nei meccanismi di difesa della cellula dai ROS e RNS prodotti durante il metabolismo cellulare. La SOD catalizza la dismutazione dell'anione superossido in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare mediante un meccanismo conservato anche in organismi filogeneticamente distanti, come gli eubatteri e gli archeobatteri. L'isolamento e la caratterizzazione di SOD anche da organismi anaerobi (Hatchikian & Henry, 1977; Dos Santos et al., 2000; Meier et al., 1982; Gregory & Dapper, 1983) fanno ritenere che le SOD siano enzimi con una funzione essenziale per l'evoluzione della respirazione aerobia a partire da un'antica forma di vita insensibile all'ossigeno.

Le SOD sono classificate in almeno tre famiglie distinte sulla base del cofattore metallico contenuto nel sito attivo, nonché delle similarità di sequenza e di struttura tridimensionale (Bannister et al., 1987). Alla prima di queste famiglie appartengono le Cu/Zn-SOD, che per ogni subunità comprendono sia lo ione Cu²⁺, con ruolo catalitico, che lo ione Zn²⁺, con ruolo strutturale. Le Cu/Zn-SOD sono presenti nel citoplasma degli eucarioti, nei cloroplasti e nel periplasma di alcuni procarioti Gram-negativi. La seconda famiglia include sia le Fe-SOD che le Mn-SOD, contenenti rispettivamente Fe o Mn come cofattore metallico nel sito attivo. Esse sono molto simili per struttura primaria e terziaria e sono considerate in relazione evolutiva. Le Fe-SOD sono presenti sia nei batteri aerobi che in quelli anaerobi, negli archaea e nei cloroplasti di alcune piante. Le Mn-SOD sono presenti in alcuni procarioti, in archaea alofili e metanogeni e nella matrice mitocondriale. Nei batteri le Fe-SOD e le Mn-SOD sono esclusivamente localizzate nel citoplasma, dove la loro azione riduce lo stress della membrana e ne conserva la funzione, proteggendo alcuni enzimi citosolici dall'inattivazione ad opera dei ROS.

La terza famiglia comprende alcune SOD presenti solo in *Streptomyces* e contenenti Ni come cofattore metallico.

1.3 RUOLO FISIOLÓGICO DEI ROS NEL SISTEMA RIPRODUTTIVO

In assoluto e come già accennato, i ROS hanno ruoli sia fisiologici che patologici nell'ambito dell'economia riproduttiva. Piccole quantità di ROS sono necessarie agli spermatozoi per acquisire capacità fecondanti. (Aitken RJ., 1997; Aitken 1999; Gagnon C. et al., 1991). Bassi livelli di ROS dunque sono necessari per la fecondazione, per la reazione acrosomiale, per la motilità e per la capacitazione (Agarwal A, et al. 2004; Griveau JF. et al., 1997). Durante la capacitazione, processo che si verifica nell'apparato genitale femminile per preparare lo spermatozoo all'interazione con l'ovocita, i livelli di calcio intra-cellulare, di ROS e di tirosin-chinasi aumentano, portando così ad un incremento dell'adenosina monofosfato ciclica (cAMP) che a sua volta favorisce un aumento della motilità. (Aitken RJ, 1995; Visconti PE et al., 1995). Tuttavia, solo gli spermatozoi capacitati mostrano un'adeguata motilità e subiscono una reazione acrosomiale acquistando così capacità fecondanti. (de Lamirande E et al., 1997). L'incubazione degli spermatozoi con basse concentrazioni di perossido di idrogeno, ha dimostrato di stimolare la capacitazione degli stessi, l'iperattivazione, la reazione acrosomiale e la fusione con l'ovocita. (Aitken RJ., 1997; Aitken RJ., 1995; de Lamirande E. et al., 1993; Kodama H. et al., 1996). Anche altri ROS, come l'ossido nitrico e l'anione superossido promuovono la capacitazione e la reazione acrosomiale: la perossidazione lipidica causata da bassi livelli di ROS porta alla modificazione della membrana plasmatica, facilitando così l'adesione spermatozoo-ovocita. (Kodama H. et al., 1996).

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) rappresentano una vasta categoria di molecole, tra cui un gruppo di radicali (ione idrossile, superossido, ossido nitrico, perossidi, ecc.) e non radicali (ozono, ossigeno singoletto, perossido lipidico, perossido di idrogeno) ossigeno

derivati (Agarwal A. et al., 2005). Questi derivati partecipano ad una cascata di reazioni che danno origine a radicali liberi e che alla fine possono danneggiare substrati organici. Specie reattive dell'azoto (ossido di azoto, perossinitrito, ossido nitrico, ecc.) rappresentano una classe di radicali liberi derivati dall'azoto e considerati una sottoclasse dei ROS (Sikka SC, 2001; Darley-Usmar V. et al., 1995). Praticamente ogni eiaculato umano contiene potenziali fonti di ROS (Aitken RJ, 1995) essendo costituito da diversi tipi di cellule, come spermatozoi maturi ed immaturi, cellule rotonde delle diverse fasi della spermatogenesi, leucociti e cellule epiteliali. Di questi tipi di cellule, leucociti e spermatozoi risultano essere le due principali fonti di ROS (Garrido N et al., 2004). Gocce citoplasmatiche ed eccesso di citoplasma residuo, spiegano l'anello mancante tra scarsa qualità dello sperma e una maggiore produzione di ROS. Gomez e coll. (1996) hanno dimostrato che le gocce citoplasmatiche, dovute a difetti del meccanismo di estrusione citoplasmatica durante il rilascio degli spermatozoi dall'epitelio germinativo nella spermatogenesi, portano alla presenza di citoplasma residuo in eccesso, rappresentando dunque , una fonte importante di ROS. Gli spermatozoi, risultano essere così, immaturi e funzionalmente difettosi. La ritenzione del citoplasma in eccesso è strettamente correlata alla produzione di ROS, attraverso meccanismi che possono essere mediati dall'enzima citosolico glucosio -6 -fosfato deidrogenasi (Aitken RJ, 1999) e che sembrerebbero essere soprattutto due : attraverso il sistema nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ossidasi (NADPH) a livello della plasma membrana dello spermatozoo (Aitken RJ et al., 1992) e dal sistema NADPH-dipendente ossido reduttasi a livello mitocondriale (Gavella M et al., 1992). Quindi gli spermatozoi immaturi , morfologicamente difettosi e i leucociti del liquido seminale dell'uomo costituiscono un'importante fonte di ROS (Aitken RJ et al., 1990). Gli spermatozoi sono ricchi in mitocondri, dato il loro costante bisogno di energia per la motilità : quando però sono presenti sue disfunzioni, si ha un aumento nella produzione di ROS (Evenson DP et al., 1982) secondo un meccanismo che porterebbe così

ad un danneggiamento della membrana mitocondriale la quale a sua volta sarebbe responsabile di un ulteriore incremento nella produzione di ROS. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) si definisce leucocitospermia (maggiore infiltrazione leucocitaria nel liquido seminale) la presenza di leucociti perossidasi-positivi in concentrazioni inferiori a 1×10^6 per millilitro di seme (World Health Organization, 1999) anche se esiste una controversia a tal riguardo (Thomas J. Et al., 1997) : da un lato parametri come la scarsa qualità, diminuzione della capacitazione e diminuzione del potenziale fecondante del materiale seminale (Wolff H, 1995) sarebbero attribuiti alla leucocitospermia, dall'altro lato non è stata stabilita nessuna correlazione tra le concentrazioni seminali di leucociti e la scarsa qualità (Tomlinson MJ, 1993) e funzionalità degli spermatozoi (Aitken J, 1994). Secondo gli studi di laboratorio di Makker et al. (2009) lo stress ossidativo si verifica anche in pazienti con una conta di leucociti seminali molto bassa (tra 0 e $1 \times 10^6/\text{ml}$), ma è anche vero che un aumento di ROS si verifica con un aumento della conta leucocitaria : quindi la presenza di eventuali leucociti è associata senza dubbio a stress ossidativo che può compromettere la fertilità. I leucociti perossidasi-positivi includono i leucociti polimorfo nucleati, che rappresentano il 50-60 per cento di tutti i leucociti seminali, e i macrofagi che rappresentano un altro 20-30 per cento (Thomas J, 1997). Nell'uomo, la ghiandola prostatica e le vescichette seminali ne rappresentano le fonti principali (Wolff H., 1995). I leucociti attivati in risposta a stimoli infiammatori, sono in grado di produrre quantità di ROS cento volte superiori ai leucociti non attivati (Plante M, 1994) attraverso un meccanismo mediato dall'aumento della produzione di NADPH. Questo danno indotto dalla produzione di ROS da parte dei leucociti attivati avviene sia in presenza di una leucocitospermia elevata (Shekarriz M, 1995) e sia quando il plasma seminale viene rimosso durante la preparazione dello stesso per la riproduzione assistita (Ochsendorf FR., 1999). La presenza di ROS, associata ad adeguati apporti di antiossidanti, hanno dunque in umana un ruolo di grande impatto sulla

fertilità. Le integrazioni con antiossidanti hanno un impatto fondamentale nella prevenzione delle alterazioni indotte dai radicali liberi. Esistono tre grandi gruppi di sostanze aventi azione antiossidante: gli antiossidanti assumibili con l'alimento, gli antiossidanti endogeni e le cosiddette proteine leganti i metalli (Agarwal A et al., 2004; Hughes CM et al., 1998). Tutte agiscono sia preservando l'integrità morfo-funzionale degli spermatozoi dalle alterazioni conseguenti ad eccessi di ROS, sia migliorando in assoluto la qualità del materiale seminale durante lo stoccaggio per il successivo utilizzo in tecniche di riproduzione assistita. Per questi motivi negli ultimi anni le principali ricerche in materia di andrologia sono state incentrate sulla valutazione dello stato ossidativo e sull'utilizzo degli antiossidanti nel seme.

1.3.1 ROS E SPERMATOZOI

Lo stress ossidativo, tra le molte cause di infertilità maschile, è stato identificato come uno dei principali fattori in grado di depauperare il potenziale fecondante degli spermatozoi e per questo negli ultimi anni è stato oggetto di studio da parte di numerosi gruppi di ricerca. Gli spermatozoi, così come qualsiasi cellula aerobica, sono costantemente sottoposti al “paradosso dell’ossigeno” (Sies H, 1993): l’ossigeno e i suoi metaboliti come i ROS a bassi livelli sono essenziali per la sopravvivenza e per il mantenimento delle normali funzioni cellulari, ma nel contempo gli eccessi nei prodotti di decomposizione (ROS appunto) ne possono compromettere funzionalità e sopravvivenza (de Lamirande E. et al 1995).

Risulta evidente che l'organismo mette in atto una serie di meccanismi miranti allo smaltimento dei livelli eccedenti di radicali liberi, nonché alla prevenzione dei danni da essi causati alle strutture cellulari, in particolar modo alle membrane plasmatiche che possono andare incontro a fenomeni di perossidazione lipidica. Tale compito è normalmente svolto all'interno dei tessuti biologici da complessi sistemi antiossidanti

comprendenti vitamine (A, E, C), elementi minerali (Selenio) e sistemi enzimatici (Super Ossido Dismutasi, SOD, o Glutathione perossidasi GSH-Px) che agiscono sia riducendo la produzione dei ROS che aumentandone la neutralizzazione e lo smaltimento. Nel momento in cui, per particolari circostanze funzionali o in condizioni patologiche particolari, la produzione dei derivati dell'ossigeno supera la capacità degli antiossidanti di smaltirli adeguatamente sopraggiunge quella condizione nota come "sindrome da distress ossidativo"

Quindi lo stress ossidativo deriva da uno squilibrio tra la produzione dei ROS e dei meccanismi antiossidanti di difesa dell'organismo. Come accennato tale squilibrio spesso è la conseguenza di un'aumentata produzione di radicali liberi e per quello che concerne il materiale seminale, diversi studi hanno dimostrato una stretta associazione tra anomalie spermatiche compromettenti la qualità dello sperma (gocce citoplasmatiche, code bifide, teste doppie) ed aumentati livelli di ROS nel plasma seminale (Aitken RJ, 1997; Aitken RJ, 1995; Visconti PE et al., 1995; de Lamirande E et al., 1995; de Lamirande E et al., 1997; Kodama H et al., 1996; Gomez et al., 1996).

Tutte le biomolecole sono potenziali bersagli dello stress ossidativo. In primis, gli acidi grassi polinsaturi (PUFAs) della membrana plasmatica sono oggetto di fenomeni di perossidazione lipidica con deterioramento tanto morfologico quanto funzionale (Ochsendorf FR, 1999; Alvarez JG et al., 1995). Meccanismi simili sono anche alla base di reazioni acrosomiali precoci. Pur non essendo ancora note le modalità eziopatogenetiche, lo stress ossidativo inficia anche molto la motilità spermatica e si è ipotizzata un'alterazione enzimatica nella cascata di produzione energetica a livello di assonema. Alte concentrazioni di ROS sono responsabili di danni clamorosi alla funzione spermatica ed in ultimo minacciano la stessa sopravvivenza degli spermatozoi attraverso alterazioni della permeabilità e perossidazione lipidica della membrana plasmatica,

inducendo frammentazione del DNA nucleare , riducendo i livelli di ATP mitocondriale e causando perdita di motilità, vitalità e potenziale fecondante (Aitken et al., 1994).

1.3.2 ROS E OOCITI

La produzione di specie reattive di ossigeno è un normale processo del metabolismo cellulare ma come accennato suoi eccessi possono comportare diversi danni alle cellule nelle quali sia accumulano; l'oocita ed il cumulo ooforo (Moor RM et al., 1980; Larsen WJ et al., 1988) da cui è circondato rappresenta un'unità inscindibile dal punto di vista anatomo-funzionale e gli scambi metabolici, così come le stimolazioni ormonali responsabili dei processi maturativi dei gameti, sono garantiti proprio dalle cellule del cumulo (Warnes GM et al., 1977). Le cellule del cumulo ooforo partecipano anche alla sintesi di sistemi enzimatici come la glutathione perossidasi (Gruppen CG et al., 1995; Yamauchi N et al., 1999) che ha un ruolo fondamentale nel corso della maturazione nel proteggere l'oocita stesso dai danni arrecati dai radicali liberi (Meister A, 1983).

A seconda della sede di produzione i ROS implicati nel deterioramento degli oociti sono l'anione superossido, il perossido di idrogeno e i radicali idrossilici che causano per ossidazione dei lipidi di membrana promuovendo la formazione di radicali perossilici (Ribarov SR et al.,1981).

Molti sono i fattori responsabili della sovrapproduzione di ROS capaci di danneggiare oociti e futuri embrioni; tra questi ricordiamo anzitutto una eccessiva presenza di ossigeno (Nagao et al., 1994), livelli elevati di metalli cationici come ferro e rame (Nasr-Esfahani et al., 1992), ed in ultimo ma fattore non trascurabile la presenza di spermatozoi anomali responsabili di alti livelli di ROS (Alvarez et al., 1996).

Recenti studi hanno messo in evidenza una correlazione diretta tra aumento dei ROS (con parallela diminuzione dei livelli di antiossidanti) e induzione della morte apoptotica cellulare (Hockenbery DM et al., 1993; Murdoch WJ, 1998), così come alterazioni di sviluppo embrionale di origine materna, in particolar modo condizioni di aneuploidia

(Tarin JJ et al., 1998). In generale possiamo dire che la presenza di uno squilibrio tra radicali dell'ossigeno e antioossidanti determina grossi deficit nei processi di maturazione oocitaria e di sviluppo embrionale in corso di IVM, IVF e IVP.

1.4 STRESS OSSIDATIVO E INFERTILITA'

L'infertilità rappresenta un grave problema clinico, tanto negli animali quanto nell'uomo. Le statistiche indicano che il 15 % di tutte le coppie negli Stati Uniti sono sterili, e che per il 25 % questi problemi sono legati a fattori maschili (Sharlip ID et al., 2002).

In realtà sono stati proposti due meccanismi di produzione dei radicali liberi, entrambi a partenza dal sistema enzimatico NADPH, uno situato sulla membrana plasmatica, l'altro in sede mitocondriale. In particolar modo nell'uomo, la principale fonte di radicali liberi nel plasma seminale è rappresentata da spermatozoi immaturi o morfologicamente anomali, così come da infiltrazioni leucocitarie nello sperma (Aitken RJ ,1990).

1.4.1 ROS E INFERTILITA' NELL'UOMO

Nell'essere umano sono state descritte alterazioni nel numero di spermatozoi regolate da fenomeni di apoptosi. L'apoptosi rappresenta una risposta non infiammatoria ad un danno tessutale caratterizzato da una serie di cambiamenti morfologici e biochimici (Sakkas D et al., 1999). Alti livelli di ROS distruggono tanto la membrana interna che quella esterna dei mitocondri inducendo il rilascio della proteina c-citocromica ed attivando l'apoptosi. Nello sperma però questo processo può essere attivato anche da fenomeni indipendenti dai radicali liberi attraverso il recettore proteico cellulare Fas. Negli uomini con parametri spermatici anomali (oligoazospermia) la percentuale di spermatozoi Fas-positivi può arrivare al 50%. In genere si può dire che campioni con basse concentrazioni contengono elevati livelli di spermatozoi Fas-positivi (Sakkas D et al., 1999).

Importanti correlazioni sono state anche accertate con alcune condizioni morbose responsabili di infertilità come il varicocele e lo stress ossidativo. Sembra che in questi

21

pazienti la produzione di radicali liberi in eccesso sia da ricondurre a particolari corredi enzimatici come la xantina ossidasi (Mitropoulos D et al., 1996; Romeo C et al., 2001).

1.4.2 ROS E INFERTILITA' NEGLI ANIMALI

La presenza di elevati livelli di acidi grassi polinsaturi nelle membrane plasmatiche degli spermatozoi di tutte le specie, pone le basi affinché su queste cellule i fenomeni di perossidazione lipidica, responsabili della produzione di radicali altamente dannosi per la funzionalità delle stesse membrane, si esplichi in forma significativamente enfatizzata rispetto ad altri distretti organici. Già nel plasma seminale (o nell'eiaculato in toto) degli uccelli è possibile mettere in evidenza fenomeni riferibili allo stress ossidativo e di contro, meccanismi antiossidanti aventi lo scopo di mitigare i danni causati da quest'ultimo (Bréque C et al., 2003).

In particolare per le specie aviarie, le similitudini delle strategie riproduttive con pesci ed insetti rendono i meccanismi di ossidazione ed i rimedi opposti ad essi dall'organismo una condizione di primaria importanza nell'economia della fertilità. Nella fattispecie, molti uccelli posseggono lungo l'ovidutto numerose piccole invaginazioni della mucosa vaginale detti Tubuli di Stoccaggio Spermatico (SSTs) all'interno dei quali una piccola ma molto selezionata quota di spermatozoi eiaculata viene conservata e "stoccata" per periodi anche lunghi per essere poi utilizzati per fecondazioni successive all'accoppiamento (Bakst et al., 1994). Da un punto di vista funzionale, tale stoccaggio di spermatozoi da parte di femmine aviarie per lunghi periodi richiede un comportamento biochimico specializzato e mirante a sostenere tanto la sopravvivenza che la capacità fecondante degli spermi. Nel momento in cui entrano all'interno degli SSTs gli spermatozoi possono andare incontro a periodi più o meno prolungati di stoccaggio. Tale periodo è condizionato da una serie organizzata ed efficiente di scambi tra i gameti maschili e le ghiandole femminili, scambi attraverso i

quali essi possono conservare la loro motilità ed il loro potere fecondante per giorni o settimane.

I lipidi sono tra i principali componenti della membrana plasmatica e intervengono in una serie di processi che in ultimo influenzano direttamente il loro potere fecondante. Da un punto di vista biochimico, la composizione lipidica della membrana plasmatica dei gameti maschili mostra notevoli differenze rispetto alle cellule somatiche. Per esempio la membrana plasmatica di spermatozoi di mammiferi, uccelli e pesci contiene non solamente alte concentrazioni di lipidi esterificati ma anche alti livelli di fosfolipidi e steroli (Scott, 1973; Parks and Lynch, 1992). I fosfolipidi degli spermatozoi aviari sono arricchiti principalmente di acidi grassi polinsaturi (PUFAs) come l'acido arachidonico e decosatetraonico (Surai et al., 1998b). Gli alti livelli di PUFAs li rendono vulnerabili alla perossidazione lipidica (Fujihara and Howarth, 1978; Cecil and Bakst, 1993; Surai et al., 1997b, 1998c, 2000a) che è uno dei principali fattori di infertilità maschile. In conseguenza di ciò le membrane spermatiche devono essere protette da sistemi antiossidanti altamente efficaci e capaci di prevenire i danni perossidativi durante lo stoccaggio in vitro ed in vivo. Diverse osservazioni nei mammiferi hanno dimostrato che la formazione dei perossidi durante lo stoccaggio in vitro del seme è seguito da alterazioni della motilità spermatica (Jones and Mann, 1973; Alvarez and Storey, 1989; Rao et al., 1989; de Lamirande and Gagnon, 1992), anomalie della coda (Rao et al., 1989), diminuzione della capacità di fusione con l'oocita e riduzione del potenziale di fertilità (Aitken, 1994). Nei polli, i livelli di produzione di MDA mostrano un rapporto di proporzionalità diretta con la riduzione progressiva di fertilità (Fujihara and Howarth, 1978; Wishart, 1984), indipendente dalla riduzione o meno della motilità (Fujihara and Howarth, 1978; Fujihara and Koga, 1984; Wishart, 1984). Risultati simili si sono ottenuti recentemente anche negli anatidi (Douard et al., 2000). Più in generale, la formazione di MDA nel seme aviario durante lo stoccaggio in

vitro è spesso associato a diminuzioni significative di PUFA's come avviene nei mammiferi.

Il sistema antiossidante presente nel plasma seminale aviario era molto poco studiato fino a una serie di recenti acquisizioni che hanno confermato l'esistenza di complessi sistemi come le vitamine A, E, C e di GSH in questi fluidi organici (Surai et al., 1997a,b, 1998c, 2000a,b). inoltre, all'interno degli spermatozoi di vitamina E raggiunge livelli nove volte superiori a quelli che si registrano nel plasma seminale di alcune specie come le galline (Surai et al., 1998c), lo stesso si può dire del GSH ma non dell'acido ascorbico che invece è uniformemente distribuito tra spermatozoi e plasma seminale.

A seguito di studi su plasma seminale e spermatozoi si è potuto ipotizzare che la vitamina E abbia un ruolo minore rispetto al suo potenziale antiossidante nel plasma seminale mentre la vitamina C può rappresentare un importante fattore antiossidante idrosolubile. Oltre a quelli appena nominati, sono stati indagati altri sistemi complessi come la GSH-Px e le SOD efficaci in diverse altre specie (Froman and Howarth, 1981; Surai et al., 1998b). entrambe le forme di GSH-Px, sia quella selenio dipendente che la indipendente, sono state osservate negli spermatozoi e nel plasma seminale. Il seme aviario contiene anche due forme di SOD, una MnSOD mitocondriale e una Zn, Fe, Cu-SOD citoplasmatica) e di queste la forma principale nella maggior parte delle specie è la MnSOD all'interno degli spermatozoi, mentre le altre forme prevalgono nel plasma seminale.

Nonostante questi meccanismi di difesa altamente specializzati, non di rado essi non sono sufficienti ad annullare completamente gli effetti tossici della perossidazione lipidica durante lo stoccaggio prolungato in vitro. Sulla base di risultati ottenuti nei mammiferi (Jones and Mann, 1977; Dawar et al., 1983; Kobayashi et al., 1991; Castellini et al., 2000) anche nel plasma seminale aviario sono stati analizzati sistemi antiossidanti eventualmente presenti nell'eiaculato. Alcuni autori nel 1984 hanno evidenziato che con l'utilizzo di particolari mestruai si può inibire la perossidazione lipidica durante lo stoccaggio in vitro

del plasma seminale al di sopra dello zero. Successivamente risultati simili sono stati mostrati negli anatidi (Cecil and Bakst, 1993). In aggiunta, l'attività di neutralizzazione dei radicali liberi nel plasma seminale di polli si è rivelato più potente rispetto alla stessa azione nel plasma ematico (Surai et al., 1998c) ma meno efficace dell'attività ritrovata nel plasma seminale di altre specie come gli anatidi (Surai et al., 1998d, 2000a).

Il discorso appena fatto per i volatili si può estendere a tutte le altre specie del regno animale, i cui spermatozoi, con l'intensa attività metabolica che ne caratterizza l'emivita, sono continuamente esposti ai danni arrecati dallo stress ossidativo. Ciò vale oltre che per l'uomo anche per altri primati come il macaco giapponese, oggetto di continui studi per le sue similitudine soprattutto genetiche con l'essere umano. La possibilità di congelare efficacemente il seme di primati non umani non solo può diventare un'importante risorsa per le ricerche biomediche, ma può anche contribuire alla conservazione di tali specie minacciate di estinzione a seguito della caccia e della distruzione del loro habitat.

Nel momento in cui la cellula è esposta a profondi cambiamenti di temperatura, l'acqua extracellulare comincia a cristallizzare e determinare variazioni nella concentrazioni dei soluti circolanti con variazioni dell'osmolarità cellulare. In risposta a tali eventi le cellule perdono liquido intracellulare verso gli interstizi restringendo progressivamente il volume citoplasmatico fino ad equilibrare le concentrazioni intra ed extracellulari (Pommer et al., 2002; Mazur P, 1963; 2004). Diversi studi hanno evidenziato che il congelamento oltre ai danni osmotici dà luogo anche a stress ossidativo (Thuwanut P et al., 2008; O'Flaherty C et al., 1997). Da recenti acquisizioni di fisiologia sembra che la produzione di bassi livelli di ROS giochi un ruolo di primo piano nel processo di capacitazione degli spermatozoi (de Lamirande E et al., 1993; Baumber J et al., 2003), nella reazione acrosomiale (Griveau JF et al., 1994; de Lamirande E et al., 2009; 1993), nell'iperattivazione (de Lamirande E et al., 1993; 1994) e nel processo di fusione con l'oocita (de Lamirande E et al., 1993).

All'opposto, eccessiva produzione di ROS da parte di spermatozoi degenerati, leucociti contaminanti o da alterati processi di crioconservazione può avere effetti deleteri sulla funzione spermatica (Aitken RJ et al., 1989, 1994, 1995; Michael A et al., 2007). Durante la normale respirazione cellulare vengono prodotti numerosi radicali liberi, ma il più comune ROS generato dagli spermatozoi è rappresentato dall'anione superossido che a sua volta può dar luogo per via enzimatica o per dismutazione spontanea al perossido di idrogeno (de lamirande E et al., 1997). Sebbene l'anione sia capace di produrre radicali più tossici rispetto al perossido, la sua emivita è molto breve (1 millisecondo) così come ne risulta limitata la permeabilità di membrana. La limitata disponibilità di enzimi antiossidanti unita alla ricchezza di acidi grassi insaturi della membrana plasmatica, rende gli spermatozoi molto vulnerabili allo stress ossidativo e all'attacco superossidante dei ROS (Baker MA et al., 2005; Neild DM et al, 2005). Nello specifico, alti livelli di ROS sono stati associati a estesi danni cellulari come danni morfologici (Aziz N et al., 2004), perossidazione lipidica e frammentazione del DNA (Fraczek M et al., 2005), ridotta reazione acrosomiale e capacità di fusione con l'oocita (Lemkecher T et al., 2005), nonché ridotta percentuale di gravidanza dopo fecondazione in vitro (Zorn B et al, 2003; Hammadeh ME et al., 2006). Si può pertanto concludere che il congelamento col conseguente stress osmotico determina progressiva produzione di ROS che riducono clamorosamente la fertilità del materiale seminale se questo non è opportunamente addizionato di antiossidanti.

1.4.3 ROS ED INFERTILITA' NEL CANE

C'è una grossa mancanza di informazioni riguardo a studi di biochimica sul seme canino. Le Specie di Ossigeno Reattivo (ROS) sono molecole attive prodotte durante la riduzione dell'ossigeno, la qual cosa è stata ricondotta a diversi effetti deleteri sulla funzione e la vitalità degli spermatozoi quando questi vengono prodotti in grosse quantità.

La perossidazione dei fosfolipidi della membrana plasmatica determina una perdita di vitalità, motilità, di elementi citoplasmatici, cambiamenti metabolici e alterazioni strutturali degli spermatozoi. Il più importante enzima antiossidante coinvolto nello smaltimento dei ROS negli spermatozoi dei mammiferi è la SOD. Lo sperma canino comprende la frazione pre-spermatocica (dall'aspetto quasi trasparente e di volume variabile tra 0,5 e 2 ml), la frazione spermatocica (lattescente, ricca di spermatozoi) e la frazione post-spermatocica (fondamentalmente costituita da fluido prostatico).

Sebbene la funzione fisiologica delle frazioni pre e post-spermatocica vada ancora chiarita, è abbastanza evidente l'azione meccanica della frazione pre-spermatocica nel favorire il passaggio degli spermatozoi attraverso la cervice uterina (England, 1990).

I ROS sono molecole attive prodotte durante la riduzione dell'ossigeno ricondotti a diversi effetti deleteri sulla funzione e vitalità degli spermatozoi quando prodotti oltre le concentrazioni ottimali (de Lamirande and Gagnon, 1995; Aitken, 1999; Saleh and Agarwall, 2002). È stato riportato che spermatozoi canini con alta percentuale di riduzione di motilità e perdita di funzionalità della membrana cellulare oltre che con elevati tassi di anomalie morfologiche producono livelli molto più alti di ROS se comparati a spermatozoi normali (Tselkas et al., 2000).

Gli spermatozoi dei mammiferi hanno un sistema enzimatico antiossidante per proteggersi dai danni dello stress ossidativo; il livello di ogni enzima è differente tra le varie specie essendo presenti tanto nel plasma seminale quanto negli spermatozoi. Il seme canino ha un sostanziale apporto di attività antiossidante simile a quello riportato per gli spermatozoi di

toro o ratto (Menella et al, 1980). È risaputo che gli spermatozoi canini sono capaci di produrre livelli significativi di ROS in certe condizioni; tale produzione è stata ritrovata in particolar modo in quegli spermatozoi con alterata funzionalità riguardante la motilità, la vitalità e le anomalie morfologiche (Tselkas et al., 2000).

L'attività enzimatica SOD-simile presente nel plasma seminale e nella frazione post-spermatICA potrebbe proteggere gli spermatozoi dallo stress ossidativo durante l'eiaculazione ed il passaggio attraverso le vie genitali femminili.

La correlazione inversa tra attività antiossidante e concentrazione spermatICA indica che i campioni di seme oligozoospermico hanno un'aumentata attività enzimatica, probabilmente dovuto agli eccessivi residui citoplasmatici come già dimostrato nell'uomo (Aitken et al., 1996) ; a loro volta gli aumentati residui potrebbero essere il frutto di alterazioni nel processo di spermatogenesi o di maturazione gametica (Aitken et al., 1994).

L'aumento dell'attività antiossidante nel plasma seminale in presenza di ridotta attività spermatozoaria potrebbe invece essere attribuito a fuoriuscita di enzimi in caso di rottura cellulare. L'aumento di permeabilità della membrana plasmatica in tali spermatozoi sembra permettere la perdita di corredi enzimatici in conseguenza dei danni di membrana indotti dal processo di congelamento (Lasso et al., 1994). La correlazione negativa tra lipidi di perossidazione e integrità acrosomiale suggerisce un'azione lesiva di tali sostanze sull'integrità e la permeabilità della membrana plasmatica così come la perdita del controllo di premature reazioni acrosomiali. Gli spermatozoi anomali mostrano alterazioni morfologiche e difetti di motilità e ciò è ulteriormente confermato dalla corrispondenza inversa tra percentuale di spermatozoi anomali e livelli di motilità sia complessiva che lineare. Il fenomeno può essere prodotto da anomalie durante il processo di spermatogenesi con alterazioni della maturazione degli spermatogoni in linee cellulari via via più specializzate. Gli spermatozoi anomali mostrano non solo anomalie morfologiche ma anche alterazioni nei processi di biosintesi energetica. Alti livelli di ROS, specialmente

perossido di idrogeno, possono impoverire notevolmente la motilità spermatica agendo sull'assonema e sulla cascata di produzione di ATP in sede mitocondriale (de Lamirande and Gagnon, 1992). In conseguenza di questi effetti deleteri, è probabile che livelli maggiori di ROS possano essere responsabili di anomalie spermatiche morfologiche, ma è necessario che ulteriori studi confermino questa ipotesi.

Nell'ambito delle tecniche di riproduzione assistita, refrigerazione e congelamento determinano effetti deleteri sulla qualità del seme anche nella specie canina, in particolar modo per quello che concerne la perossidazione dei lipidi di membrana (Bileski BHJ et al, 1983). Questa particolare suscettibilità è legata all'alto contenuto delle membrane stesse in acidi grassi polinsaturi (PUFAs) la cui ossidazione è alla base delle alterazioni sopra descritte. In realtà, una particolarità del seme canino è la notevole variabilità individuale nella sensibilità ai processi di crioconservazione e la conseguente azione della perossidazione di membrana e di conseguenza sono state svolte diverse ricerche miranti a quantificare l'entità e gli effetti di tali processi sulla qualità dello sperma (Pap EHW et al, 1999; Ortega Ferrusola C et al, 2009). In questa specie le notevoli differenze individuali alla risposta della crioconservazione può essere correlato anche agli scarsi livelli di ROS prodotti durante e dopo il congelamento in virtù della quasi esclusiva fonte di radicali ossidrilici in sede mitocondriale. Essendo profondamente depressa l'attività dei mitocondri durante lo stoccaggio si verifica anche uno scarso accumulo di ROS il cui livello, pertanto, va in questa specie sempre contestualizzato e rapportato all'efficacia dei sistemi antiossidanti endogeni o adottati per preservare la qualità dello sperma (Peña FC et al, 2009; Rijlin J et al, 2004; Aitken J et al, 1998; Lewis B et al, 2001; Ecroyd H et al, 2003; Neagu VR et al, 2010).

1.4.4 ROS ED INFERTILITA' NEL CAVALLO

Sono poche le informazioni sull'influenza dei ROS sulla funzione spermatica nell'equino specificatamente sulla motilità, vitalità, integrità acrosomiale, potenziale di membrana mitocondriale e sulla perossidazione lipidica. In uno studio di Aurich et al del 1997 l'acido ascorbico, usato come antiossidante, aveva un'azione protettiva sull'integrità di membrana dopo la refrigerazione del seme, la qual cosa suggeriva che il danno provocato dai ROS potesse essere ricondotto a perdita di funzione spermatica durante lo stoccaggio.

Diversi lavori hanno mostrato come la risposta allo stress ossidativo negli equini sia molto simile a quanto si verifica per gli spermatozoi umani, mostrando incrementi di produzione di perossido di idrogeno (Griveau et al, 1995) ed anioni superossidi (de Lamirande and Gagnon, 1992a;) dopo incubazione in sistemi capace di produrre alti livelli di radicali liberi. Inibizione della motilità a seguito di aggiunta di un sistema di iperossidazione è stata pure osservata negli spermatozoi di uomo e topo (de Lamirande and Gagnon, 1992a,b; Baiardi et al, 1997).

Così come nell'uomo, anche per la funzione spermatica degli equini sono fondamentali i ROS (Aitken and Clarkson, 1987; Aitken et al, 1997)(Ball et al, 2001) i quali a basse concentrazioni regolano tutti i processi di maturazione e capacitazione gametica, ma quando la loro produzione supera la capacità dell'organismo di smaltirli in maniera adeguarsi verificano tutti i danni già accennati ai parametri spermatocitari. In aggiunta ai danni ai lipidi della membrana plasmatica, si verificano in questa specie fenomeni di frammentazione del DNA con conseguente perdita di vitalità (Hughes et al, 1996; Kodama et al, 1997; Twigg et al, 1998c, PDF 13) . Nell'uomo si è potuto dimostrare come aggiungendo a sospensioni di spermatozoi del plasma seminale si riducono clamorosamente i danni al DNA (Twigg et al, 1998a; Potts et al, 2000, PDF 13) probabilmente in virtù dei sistemi antiossidanti naturali presenti fisiologicamente in questo liquido biologico. Anche nella specie equina si è potuta dimostrare un'azione simile (Ball

30

et al, 2000)(Baumber et al, 2001, PDF 13) e nella fattispecie pare che un ruolo di primo piano sia svolto dalle catalasi. Poichè nel trattamento del materiale seminale destinato allo stoccaggio a basse temperature è previsto l'allontanamento del plasma seminale, risulta quasi automatica l'esposizione degli spermatozoi allo stress ossidativo con associati fenomeni di perossidazione lipidica e riduzione della motilità (Ball and Vo, 2002) (Linfor and Meyers, 2002, PDF 13) . Anche per ciò che concerne il danno al DNA sembra più probabile l'azione del perossido di idrogeno piuttosto che dell'anione superossido, in virtù soprattutto della benefica risposta alle integrazioni in questa specie con catalasi piuttosto che con SOD (Hughes et al, 1998; Donnelly et al, 1999, PDF 13) .

La produzione di ROS da parte degli spermatozoi di cavallo sembra essere regolata da sistema ossidasico NADPH attraverso un meccanismo simile a quello descritto per i leucociti (Aitken et al, 1992, 1997; Ball et al, 2001; Banfi et al, 2001, PDF 13) , così come i processi di stoccaggio a basse temperature si rendono praticamente sempre responsabili di incrementate produzioni di ROS e di conseguente danno al DNA (Ball et al, 2001, PDF 13).

Sebbene fosse evidente il declino della motilità, non si è potuto stabilire un egual decremento degli altri parametri spermatici, cosa questa in contrasto con studi effettuati in precedenza su altre specie dove si dimostrava uno spiccato calo della vitalità degli spermatozoi incubati in presenza di ROS.

Sono stati proposti diversi meccanismi atti a spiegare le dinamiche di perdita di motilità spermatica e uno di quelli più frequentemente considerati è la per ossidazione degli acidi grassi polinsaturi delle membrane plasmatiche (Aitken et al, 1989, 1993b,c). gli spermatozoi sono molto sensibili a tali per ossidazioni vista l'abbondanza di acidi polinsaturi di membrana ed in conseguenza della perdita di queste sostanze si verifica un'elevata produzione di radicali perossilici e alcolici. Questi ultimi promuovono la catena delle per ossidazione con formazioni di aldeidi tossiche (Aitken, 1995). L'elevata

concentrazione di acidi polinsaturi è necessaria per rendere la membrana più flessibile possibile e potenziare la motilità cellulare e i meccanismi di fusione con l'oocita insieme all'integrità della parete acrosomiale. Inoltre la perdita di integrità di membrana può determinare fuoriuscita di ioni intracellulari con ulteriore deterioramento dei meccanismi di motilità. E' stato ipotizzato che la motilità fosse inibita attraverso meccanismi differenti da quelli della per ossidazione lipidica. Nelle cellule somatiche sembra che il perossido di idrogeno determini alterazioni di importanti funzioni biochimiche, come la formazione di suffidrili tossici intracellulari, rapida riduzione dell'ATP e diminuzione del flusso glicolitico. Questi processi avvengono prima sia della perdita di integrità di membrana che della per ossidazione (Hyslop et al, 1986, 1988). Anche altri autori hanno suggerito che la perdita di motilità fosse legato alla rapida deplezione di ATP e a conferma di ciò è stato dimostrato un rapido decremento dei livelli spermatici di ATP dopo un'ora di incubazione in presenza di ROS. Nello specifico è stato proposto che la perdita di motilità fosse legata ad una riduzione di fosforilazione delle proteine presenti nell'assonema e ulteriori studi indicano che i ROS inibiscono uno o più enzimi deputati tanto alla fosforilazione ossidativa quanto alla glicolisi con limitata produzione di ATP da parte delle cellule spermatiche.

I ROS possono anche alterare la motilità spermatica interferendo con le attività mitocondriali. Armstrong et al nel 1999 hanno riportato che basse concentrazioni di perossido di idrogeno sono responsabili di una inibizione della motilità spermatica e di una riduzione della sintesi di ATP senza alcun aumento dei lipidi di perossidazione o significativi declini del potenziale di membrana mitocondriale. Hanno pertanto proposto che il sito metabolico di azione del perossido di idrogeno negli spermatozoi umani non fosse la fosforilazione ossidativa membrana dipendente dei mitocondri come accennato da de Lamirande e Gagnon nel 1992. Hanno invece suggerito che il ruolo di tale ROS sull'inibizione del movimento spermatico avvenisse in seguito alle modificazioni dei siti

metabolici a monte della fosforilazione ossidativa; sono ovviamente necessari ulteriori studi per chiarire dove precisamente si verifichino questi intoppi. é per questo che non è ancora del tutto chiaro come i ROS agiscano nel deteriorare parametri come la motilità degli spermatozoi.

Grazie alla risposta positiva all'azione delle catalasi, inibitore selettivo del perossido di idrogeno, nel ridurre la perdita di motilità, si è potuto constatare come nella specie equina tale molecola rappresenti il principale radicale implicato nella spermo-tossicità. All'opposto, la SOD non era capace di prevenire la riduzione della motilità spermatica in presenza di ROS ed essendo l'anione superossido inibito da esso indirettamente possiamo desumere una scarsa citotossicità dell' O_2^- . queste osservazioni sono in linea con precedenti studi sugli effetti dei singoli ROS su spermatozoi umani (Aitken et al, 1993a). va ancora esaminata la citotossicità di altri ROS e la capacità dello sperma equino di produrre glutathione-perossidasi.

Poichè il perossido di idrogeno gioca un ruolo primario nel determinismo del danno agli spermatozoi equini indotta da sovrapproduzione di ROS durante lo stress ossidativo indotto dallo stoccaggio, le catalasi potrebbero rappresentare un'eccellente opzione per futuri accorgimenti nello stoccaggio di sperma equino. In questa specie, la motilità nei confronti dello stress ossidativo è un indicatore più sensibile della vitalità, dell'integrità acrosomiale, della perossidazione lipidica e del potenziale di membrana mitocondriale. Questo risultato suggerisce altresì che la motilità degli spermatozoi equini possa essere assoggettata ad un insieme di effetti tossici dei ROS indipendenti da perossidazioni lipidiche e alterazioni del potenziale di membrana come riportato in studi passati sugli spermatozoi umani.

1.4.5 ROS ED INFERTILITA' NEI FELINI

La maggior parte dei felini selvatici risulta a rischio di estinzione o comunque fortemente minacciato e molti di essi in condizioni di cattività sono affetti da anomalie riproduttive come per esempio la teratozoospermia (anomalie morfologiche degli spermatozoi superiori al 60%) che ne depauperano fortemente il potenziale riproduttivo (Luvoni , 2006). Un ottimale modello di studio per il potenziamento delle ART nei felini si è dimostrato in tal senso il gatto domestico (Donoghue AM et al., 1992). I programmi di riproduzione assistita mediante le ART trova pertanto in questo gruppo di animali enormi applicazioni e le ricerche sono volte a mitigare quanto più possibile i danni che i gameti possono subire durante i processi di raccolta, maturazione e conservazione (Watson PF, 2000). Durante tali procedure numerosi sono i momenti critici ma è comprovato l'effetto deleterio dello stress ossidativo (Agarwal A et al., 2003, ROS), in particolar modo per quello che concerne i fenomeni di per ossidazione dei lipidi di membrana (Silva PFN , 2006).

1.5 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Scopo di questo studio è stato quello di valutare gli effetti dell'aggiunta di SuperOssido Dismutasi (SOD) ai media comunemente impiegati per la conservazione e maturazione di gameti di carnivori ed equidi.

Per raggiungere tale obiettivo, il lavoro si è dipanato su tre linee di ricerca parallele e precisamente:

- Aggiunta di SOD al mestruo comunemente impiegato per la conservazione di seme equino refrigerato e raffronto nella valutazione di vitalità, motilità complessiva e lineare, integrità acrosomiale, fosforilazione della proteina ERK (recettore extracellulare kinasi-dipendente) e frammentazione del DNA tra gruppi sperimentali (addizionati con SOD) e controlli a differenti tempi di stoccaggio;
- Aggiunta di SOD al mestruo comunemente impiegato per la conservazione di seme canino refrigerato e raffronto nella valutazione di vitalità, motilità complessiva tra gruppi campione (addizionati con SOD) e controlli a differenti tempi di stoccaggio;
- Aggiunta di SOD ai media comunemente impiegati per la conservazione di ovaia di gatto refrigerate, valutando il danno molecolare, tissutale e la vitalità degli ovociti raccolti post conservazione nonché la capacità di sviluppo degli stessi e diproduzione embrionale in vitro tra gruppi campione (addizionati con SOD) e controlli a differenti tempi di stoccaggio.

CAPITOLO 2 – MATERIALI E METODI

2.1 FASE SPERIMENTALE 1-PARTE I

EFFETTO DELL'INTEGRAZIONE DI SOD (SUPEROSSIDO DISMUTASI) NEL MESTRUO SULLA MOTILITÀ, VITALITÀ, STATO ACROSOMIALE E FOSFORILAZIONE DELLA PROTEINA ERK (RECETTORE EXTRACELLULARE KINASI-DIPENDENTE) IN SPERMATOZOI REFRIGERATI DI STALLONE

2.1.1 ANIMALI

Sono stati utilizzati 5 stalloni d'età compresa tra 9 e 21 anni e peso compreso tra 400 e 600 kg. Tutti sono stati stabulati in box e avendo accesso all'aperto dalle 7,00 alle 16,00. Sono stati alimentati con concentrato due volte al giorno e con fieno e acqua “*ad libitum*”.

I campioni di seme sono stati raccolti 2 volte a settimana per 8 settimane tra gennaio e marzo 2010 per un totale di 16 prelievi a stallone e complessivi 80 campioni. Per ridurre la variabilità individuale alla risposta all'aggiunta di SOD in relazione alla concentrazione e al plasma seminale sono stati usati stalloni con concentrazioni note e costanti di seme intorno a $173 \pm 8,6 \times 10^6$ spz/ml. Al fine di valutare gli effetti dell'aggiunta di SOD a basse concentrazioni nei mestruai usati per lo stoccaggio a 5°C, ogni eiaculato è stato diviso in 5 aliquote: seme tal quale appena raccolto (controllo 1), seme diluito in Kenney extender 1:3 (EZ-Mixin® _ ARS®, CA) (controllo 2); le altre 3 quote erano preparate previa centrifugazione e allontanamento del surnatante fino a concentrazione standard di 600×10^6 spz/ml in Kenney extender senza SOD (controllo 3), con SOD a 25 UI/ml (campione sperimentale 1) e a SOD a 50 UI/ml (sperimentale 2).

L'attività enzimatica antiossidante negli spermatozoi equini sembra essere in maniera predominante presente nel plasma seminale, molto meno nelle membrane plasmatiche. Per questo la rimozione del plasma seminale per il trattamento dello sperma da stoccare aggrava i danni da stress ossidativo nell'equino (Baumber J et al., 2005). Come descritto la

SOD è stata aggiunta solo ai campioni a cui era già stato sottratto il 75% del plasma, per valutare l'effetto sul liquido seminale conservato a 5°C secondo le metodiche standard che dimostrano gli effetti negativi di questo sulla conservazione del seme equino a 5°C. Ognuna delle 5 aliquote è stata sottoposta ad indagini a 3, 24, 48, 72 ore di refrigerazione; tutte le aliquote sono state sottoposte ad esame della motilità, vitalità, stato acrosomiale e oltre a valutare l'azione della SOD nel ridurre i danni da stress ossidativo, è stato determinato il livello di fosforilazione della proteina ERK.

2.1.2 RACCOLTA DEL SEME

Il seme è stato raccolto con vagina artificiale tipo Missouri; per ogni eiaculato è stata rimossa la frazione gelatinosa ed il seme filtrato in maniera sterile. Il seme è stato esaminato con un test di fertilità generale e quindi valutati parametri come la motilità, la vitalità, l'integrità acrosomiale e la concentrazione.

2.1.3 TEST DI MOTILITÀ E VITALITÀ

La motilità progressiva è stata valutata usando un microscopio contrastografico a 100x. La percentuale di spermatozoi motili in linea retta da 8 campi selezionati a caso in ogni campione è stata valutata in camera di Makler a 37° C . La vitalità veniva stimata prima e dopo la refrigerazione a differenti momenti con la colorazione all'eosina (Viability stain–Europath, Naples, Italy). La vitalità è stata valutata anche con la colorazione eosina-nigrosina (NE) preparata secondo quanto descritto da Tamuli e Watson (Tamuli M et al.,1994). Il campione di sperma diluito (5 µl) è stato miscelato con il colorante NE (10 µl) a 37°C, incubato per 30 s, strisciato e lasciato asciugare su un vetrino caldo a 37 °C. I campioni sono stati esaminati con microscopio ottico a 400x. Gli spermatozoi vivi non si coloravano mentre quelli morti assumevano una tonalità rosa; la percentuale di spermatozoi vivi veniva espressa come percentuale di vitalità .

2.1.4 VALUTAZIONE DELLO STATO ACROSOMIALE

Gli spermatozoi con acrosoma intatto sono stati valutati con due differenti colorazioni; la clortetraciclina (CTC) (Sigma Aldrich, Milan, Italy, C4881) e la colorazione alla fluorescenza coniugata lectina agglutininina (PNA-FITC) (Vector Laboratories, FL, USA) (Nagy S et al., 2003). La soluzione CTC è stata realizzata con 5 ml di CTC buffer (TRIS solution: 3,634 g di Idrossimetilaminometano, 0,50 g di Fruttosio, 1,998 g di Acido Citrico monoidrato in 100 ml di acqua, 2 mg di CTC e 4.4 mg di cisteina). Il campione di seme è stato diluito con mezzo di coltura proteolitico 199 alla diluizione di 3:1 (v/v) e centrifugato a 300 g per 20 min. Il surnatante è stato rimosso e il pellet risospeso in Earle's medium con l'aggiunta del 4 % di albume di siero bovino. Ad aliquote di 45 µl di ciascun campione spermatico sono stati aggiunti 45 µl di soluzione CTC, 1 µg/ml di iodio propidio e 8 µl al 12,5% (w/v) di paraformaldeide e così miscelati. Gocce da 10 µl dei campioni spermatici fissati e colorati sono stati posizionati sui vetrini con l'aggiunta di gocce di soluzione fissante acquosa (Vectashield, Vector Laboratories, Peterborough, UK) per ritardare la scomparsa della fluorescenza. La colorazione CTC è stata osservata mediante microscopio laser confocale LSM-510 (Zeiss, Gottingen, Germany). La CTC è stata eccitata a 420 nm e rilevata tramite un filtro "*band-pass*" a 500 nm. Lo iodio propidio è stato eccitato a 488 nm e rilevato tramite un filtro "*long-pass*" a 560 nm. Le diverse immagini sono state scansionate separatamente, con l'installazione appropriata del percorso ottico per l'eccitazione e l'emissione di ogni scansione, secondo modalità precedentemente pubblicate (Borzacchiello G et al., 2007). La caratteristica colorazione con CTC delle cellule è stata così osservata, fotografata e descritta. Con la CTC sono stati distinti 3 differenti tipi di acrosoma: F, non capacitati con acrosoma intatto, B capacitati con acrosoma intatto, AR capacitati con reazione acrosomiale avvenuta (Baumber J et al., 2000; Tamuli M et al., 1994). Per ulteriori conferme la percentuale di spermatozoi con acrosoma capacitato è stata valutata

microscopicamente su strisci di seme asciugati all'aria usando la colorazione PNA-FITC. Un'aliquota del campione di sperma è stato strisciato sui vetrini e lasciato asciugare all'aria. Gli spermatozoi sono stati poi permeabilizzati con metanolo per 15 minuti a temperatura ambiente, lavati una volta con 25 mM di Tris soluzione salina tampone a pH 7,6 per 5 minuti, e poi due volte con acqua a intervalli di 5 min, asciugati all'aria e poi incubati con soluzione PNA-FITC (60 µg / ml) per 1 ora, lavati due volte con acqua a intervalli di 5 minuti, e montati con Vectashield. Per ogni esperimento, sono stati valutati almeno 100 cellule per vetrino. I risultati osservati con il metodo di colorazione PNA-FITC sono stati descritti in diverse specie di mammiferi e sono stati descritti come acrosomi intatti (AI) e reazione acrosomiale (AR). Le cellule con tonalità verdastre sopra la testa erano ritenute intatte dal punto di vista acrosomiale, mentre quelle con la tonalità ad una banda centrale o non colorate si consideravano capacitate.

2.1.5 ANALISI WESTERN BLOT

L'attività MAPK (ERK) è stata valutata con anticorpi anti-ERK specifici in metodica Western blotting. Ogni banda anti-fosfo-erk è stata normalizzata con la corrispondente anti-ERK per essere letta. Gli spermatozoi sono stati precipitati per centrifugazione a 1.500 g per 10 minuti a temperatura ambiente, e lavati ancora una volta. I pellets sono stati conservati a 20 ° C fino all'utilizzo. I passaggi successivi sono stati realizzati a 4 ° C. Il pellet scongelato è stato risospeso in un volume minimo di tampone lisante (50 µl per 3 10^7 celle) con 50 mM di Tris-HCl a pH 8,0, 2 mM di EGTA, 20 mM di NaCl, 1,0 mM di ortovanadato di sodio, 25 mM di β-glicerofosfato, 100 mM di acido ocladico, 0,50% di Nonidet P-40, 1mM di benzidina, 10 µg / ml di aprotinina, 10 µg / ml leupeptina, 1 mM di fenilmetilsulfonil fluoruro e 2 mM di ditiotreitolo. Dopo centrifugazione a 10.000 g per 15 min a 4 ° C, la concentrazione di proteine del surnatante è stata determinata dal saggio di Bradford.

Per misurare ERK1 / 2, 30 g di proteine sono state diluite in 5 ml di tampone di carico (10 g / l SDS, 10% di glicerolo, 1% di 2-mercaptoetanololo, 5mM di Tris-HCl a pH 6,8), bollite per 5 minuti, e separate su due gel per elettroforesi al 4-12 % di poliacrilammide sodio dodecil fosfato (SDS-PAGE). Dopo elettroforesi, il primo gel è stato colorato con Coomassie-blu: il gel è stato fissato con il 25 % di alcol isopropilico (IPA) con il 10 % di acido acetico (HoAc) in acqua per 60 minuti; il gel è stato colorato con il 10% di HoAc in acqua con 60mg / L di Comassie blu R-250, con comparsa delle bande in 30 min, infine decolorate in gel con il 10% di HoAc per 2 ore o più e conservate in gel con il 7% di HoC. Il secondo gel secondo è stato sottoposto ad electro blotting per trasferire le proteine su lamine di polivinilidene fluoride e lavate poi con tampone salino solfato (PBS). Dopo il lavaggio, la lamina è stata incubata in tampone bloccante (2 g / l di caseina altamente purificata, 1 g / l di Tween 20 in PBS) per 1 ora e poi sondata per 1 ora con l'anticorpo Anti-ERK 1 / 2 (1:5000, Promega, USA). In un secondo momento, anticorpi anti IgG e IgM di capra e di coniglio coniugati con fosfatasi alcalina sono stati diluiti 1:5.000 in 5 ml di tampone bloccante ed aggiunti per 1 ora, dopo due lavaggi in 20 ml di blocking buffer. L'ultimo lavaggio è stato effettuato tre volte con 20 ml di blocking buffer, e infine, il rilevamento è stato ottenuto con un substrato chemiluminescente CSPD (Tropix, Bedford, MA).

Per testare carichi standard di proteine (30 g) sono stati utilizzati anticorpi anti-actina (Sigma Aldrich, Milano, Italia) diluiti 1:1000 o in soluzione Ponceau S (in acido acetico allo 0,5%).

La proteina ERK1 / 2 è stata quantificata da analisi densitometriche ed i risultati sono stati espressi come densità ottica.

2.1.6 ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) effettuata utilizzando GraphPad in versione Stat per Windows XP e da MedCalc software (Frank Shoonjans, V.7.2.1.0); I risultati di comparazione tra i gruppi sperimentali sono stati effettuati con il Tukey-Kramer test di comparazione multipla. Differenze con valori di $P < 0.05$ sono state considerate statisticamente significative. I dati sono stati presentati come media \pm errore standard (SEM).

2.2 FASE SPERIMENTALE 1- PARTE II

EFFETTI DELL'INTEGRAZIONE DI SOD (SUPEROSSIDO DISMUTASI) NEI MESTRUI PER VALUTARE LA FRAMMENTAZIONE DEL DNA DI SPERMATOZOI EQUINI REFRIGERATI

2.2.1 ANIMALI

Sono stati utilizzati 4 stalloni fertili d'età compresa tra 12 e 19 anni e peso compreso tra 400 e 600 kg. Tutti sono stati stabulati in box avendo accesso all'aperto dalle 7,00 alle 16,00. Sono stati alimentati con concentrato due volte al giorno e con fieno e acqua "ad libitum".

2.2.2 PIANO SPERIMENTALE

I campioni di seme sono stati raccolti 2 volte a settimana per 8 settimane tra gennaio e marzo 2010 per un totale di 16 prelievi a stallone e complessivi 60 campioni. Al fine di valutare gli effetti dell'aggiunta di SOD a basse concentrazioni nei mestruai usati per lo stoccaggio a 5°C, ogni eiaculato è stato diviso in 5 aliquote: seme tal quale appena raccolto (controllo 1), seme diluito in Kenney extender 1:3 (EZ-Mixin® _ ARS®, CA) (controllo 2); le altre 3 quote erano preparate previa centrifugazione e allontanamento del surnatante fino a concentrazione standard di 600×10^6 spz /ml in Kenney extender senza SOD (controllo 3), con SOD a 25 UI/ml (campione sperimentale 1) e a SOD a 50 UI/ml (sperimentale 2). Tutte le aliquote sono state refrigerate a 5°C e sottoposte a fertility test ai

differenti tempi (3h, 24h, 48h e 72h). Per valutare la frammentazione del DNA ai differenti tempi di stoccaggio è stato utilizzato l'APO-BrdUtm TUNEL Test.

2.2.3 RACCOLTA DEL SEME

Il seme è stato raccolto con vagina artificiale tipo Missouri; per ogni eiaculato è stata rimossa la frazione gelatinosa ed il seme filtrato in maniera sterile. Il seme è stato esaminato con un test di fertilità generale e quindi valutati parametri come la motilità, la vitalità e concentrazione.

2.2.4 TEST DI MOTILITÀ E VITALITÀ

La motilità progressiva è stata valutata usando un microscopio contrastografico a 100x. La percentuale di spermatozoi motili in linea retta da 8 campi selezionati a caso in ogni campione è stata valutata in camera di Makler a 37° C . La vitalità è stata stimata prima e dopo la refrigerazione a differenti momenti con la colorazione all'eosina (Viability stain–Europath, Naples, Italy). La vitalità è stata valutata anche con la colorazione eosina-nigrosina (NE) preparata secondo quanto descritto da Tamuli e Watson (Tamuli M et al.,1994). Il campione di sperma diluito (5 µl) è stato miscelato con il colorante NE (10 µl) a 37°C, incubato per 30 s, strisciato e lasciato asciugare su un vetrino caldo a 37 °C. I campioni sono stati esaminati con microscopio ottico a 400x. Gli spermatozoi vivi non si coloravano mentre quelli morti assumevano una tonalità rosa; la percentuale di spermatozoi vivi veniva espressa come percentuale di vitalità .

2.2.5 VALUTAZIONE DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA

Le cellule spermatiche sono state ottenute e fissate con paraformaldeide come descritto da Arends MJ et al.1990; 1995; Bortner Cd et al.,). I campioni sono stati pellettati tramite centrifugazione a 1100 giri per 10 minuti e risospesi in 0,5 ml di PBS alla concentrazione di 1×10^6 . La sospensione così ottenuta è stata aggiunta a 5 ml di soluzione all'1% (w/v) di paraformaldeide in PBS e posta in ghiaccio per 15 minuti. Tale sospensione è stata poi

centrifugata a 600g per 5 minuti per eliminare il surnatante. A sua volta questo pellet è stato risospeso in 0,5 ml di PBS e aggiunto a 5 ml di etanolo al 70% (v/v) in ghiaccio secco. Gli spermatozoi così fissati sono stati congelati a -20°C per diversi giorni prima di essere colorati. Successivamente è stato effettuato il TUNEL test.

Il protocollo di colorazione del TUNEL test è stato effettuato come descritto di seguito (da protocollo TUNEL-Am J Pathol 136,593, 1990; Mitchell LA et al., 2010).

Da ogni campione è stato prelevato un quantitativo pari ad 1 ml e poi centrifugato in una falcon a 300 g per 5 minuti, dopodiché è stato rimosso il surnatante , risospeso in 1ml di wash buffer (buffer di lavaggio) centrifugato nuovamente e rimosso il surnatante. Nella seconda fase si è passati alla preparazione della DNA-labeling solution : per ogni campione sono stati preparati 50 µl di tale soluzione costituita da una miscela di: 10 µL di reaction buffer (buffer di reazione), 0.75 µL di TdT enzyme , 8.0 µL di BrdUTP e 31.25 µL di dH₂O (acqua distillata). A questo punto i campioni controllo e i campioni da testare sono stati risospesi in 50 µl di detta soluzione e incubati a 37-38°C per 60 minuti, agitando ogni 15 minuti. Dopo l'incubazione , ogni campione è stato lavato con 1 ml di rinse buffer , centrifugato e dopo l'allontanamento del surnatante, nuovamente lavato con rinse buffer. Nella terza fase si è passati alla preparazione dell' antibody staining solution : per ogni campione sono stati preparati 100 µL di tale soluzione costituita da 5.0 µL di Alexa Fluor® 488 dye-labeled anti-BrdU antibody e da 95 µL di rinse buffer. I pellets di ogni campione sono stati risospesi in 100 µL di detta soluzione e incubati per 30 minuti a temperatura ambiente proteggendoli dalla luce. Dopo l'incubazione sono stati preparati i vetrini con una goccia da 50 µL (metà del campione) ciascuno impiegando una pipetta graduata, strisciando immediatamente la goccia e lasciando asciugare all'aria proteggendoli dalla luce. La restante parte della soluzione (50 µL per campione) è stata colorata con 250 µL di propidium iodide/RNase A staining buffer (propidio iodide) e incubata per 30 minuti a temperatura ambiente proteggendola dalla luce. Con questa

43

soluzione sono stati preparati vetrini (preventivamente nominati) con gocce da circa 100 μ L ognuno, strisciati immediatamente e lasciati asciugare all'aria proteggendoli dalla luce. Il calcolo finale dell'incorporazione BrdU ai frammenti di DNA veniva ottenuto attraverso anticorpi colorati anti-BrdU Alexa Fluor® 488. Questo colorante ha un'eccitazione ed un'emissione simile alla fluoresceina. La colorazione di cui sopra veniva osservata al microscopio laser confocale LSM.510 e la fluorescenza veniva misurata al di sopra di un'eccitazione di 15 mW argon-ion laser. Il propidio iodide veniva eccitato a 488 nm e valutato tramite filtro come descritto in precedenti pubblicazioni (RJ Aitken et al., 2010). La frammentazione del DNA veniva captata attraverso la registrazione della percentuale di cellule emettenti fluorescenza verde. I risultati sono stati espressi come percentuale di positivi sull'intera popolazione osservata (100 spz per vetrino a 400x).

2.3 FASE SPERIMENTALE 2

EFFETTO DELL'INTEGRAZIONE DI SOD (SUPEROSSIDO DISMUTASI) NEL MESTRUO SULLA MOTILITÀ E VITALITÀ DI SPERMATOZOI REFRIGERATI DI CANE.

2.3.1 ANIMALI

Sono stati utilizzati 5 cani di razza meticcia con età compresa tra 2 e 5 anni di età, alimentati con mangimi commerciali e con peso variabile da 10 a 25 kg.

2.3.2 PIANO SPERIMENTALE

Il materiale seminale è stato raccolto mediante massaggio manuale presso l'ambulatorio di Clinica Ostetrica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli; dopo valutazione mediante fertility test di ogni eiaculato, il plasma seminale è stato allontanato mediante centrifugazione a 700 giri per 6 minuti ed ogni pellet diviso in tre aliquote; ciascuna aliquota è stata diluita con Tris extender, glucosio e tuorlo d'uovo fino ad arrivare ad una concentrazione di $60-70 \times 10^6$ spz/ml. Al fine di valutare gli effetti dell'aggiunta di SOD

nel mestruo usato per lo stoccaggio a 4°C , le aliquote sono state suddivise in 3 gruppi da 5 aliquote ognuno con l'aggiunta rispettivamente delle seguenti concentrazioni di SOD : 0 (gruppo controllo), 10 UI /ml (gruppo sperimentale 1) e 20 UI/ml (gruppo sperimentale 2). Tutte le aliquote sono state refrigerate a 4°C e sottoposte a fertility test ai differenti tempi (1h, 24h, 48h e 72h).

2.3.3 TEST DI MOTILITÀ E VITALITÀ

La motilità progressiva è stata valutata usando un microscopio contrastografico a 100x. La percentuale di spermatozoi motili in linea retta da 8 campi selezionati a caso in ogni campione è stata valutata in camera di Makler a 37° C . La vitalità è stata stimata prima e dopo la refrigerazione a differenti momenti con la colorazione all'eosina (Viability stain–Europath, Naples, Italy). La vitalità è stata valutata anche con la colorazione eosina-nigrosina (NE) preparata secondo quanto descritto da Tamuli e Watson (Tamuli M et al.,1994). Il campione di sperma diluito (5 µl) è stato miscelato con il colorante NE (10 µl) a 37°C, incubato per 30 s, strisciato e lasciato asciugare su un vetrino caldo a 37 °C. I campioni sono stati esaminati con microscopio ottico a 400x. Gli spermatozoi vivi non si coloravano mentre quelli morti assumevano una tonalità rosa; la percentuale di spermatozoi vivi è stata espressa come percentuale di vitalità .

2.3.4 ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) effettuata utilizzando GraphPad in versione Stat per Windows XP e da MedCalc software (Frank Shoonjans, V.7.2.1.0); I risultati di comparazione tra i gruppi sperimentali sono stati effettuati con il Tukey-Kramer test di comparazione multipla. Differenze con valori di $p < 0.05$ sono state considerate statisticamente significative. I dati sono stati presentati come media \pm errore standard (SEM).

2.4 FASE SPERIMENTALE 3

EFFETTO DELL'INTEGRAZIONE DI UNA NUOVA ISOFORMA DI SOD (rMnSOD) NEI MESTRUI UTILIZZATI PER LO STOCCAGGIO DI OVAIE DI GATTO.

MATERIALI E METODI

2.4.1 ANIMALI

Sono state utilizzate 45 femmine di gatto domestico di razza europea (*Felis catus*) tra 1 e 8 anni di età, in varie fasi del ciclo estrale, alimentate con mangimi commerciali e con peso variabile da 2,5 a 4 kg.

2.4.2 PIANO SPERIMENTALE

Le ovaie sono state raccolte mediante ovarioisterectomia di routine in una struttura clinica veterinaria (Clinica Veterinaria del bosco) e mantenute in Dulbecco's PBS con l'aggiunta di 75 µg/ml Kanamicina con l'aggiunta (gruppo sperimentale) di rMnSOD o tal quale (gruppo controllo) a 4 °C per 3 h (n = 30; 15 gruppo controllo e 15 gruppo sperimentale), 24 h (n = 30; 15 gruppo controllo e 15 gruppo sperimentale) e 48h (n = 30; 15 gruppo controllo e 15 gruppo sperimentale).

Per ogni gruppo l'effetto dell'aggiunta di SOD è stato testato mediante valutazione istologica (H) del danno tissutale subito dalle ovaie, valutazione dell'attivazione del gene pro-apoptotico BAX mediante esame RT-PCR (M), valutazione della vitalità degli ovociti raccolti dalle singole ovaie e loro capacità di sviluppo in vitro (F).

L'esperimento è stato eseguito dieci volte in un periodo di 16 settimane. Le ovaie raccolte sono state casualmente divise nei gruppi istologico (H), molecolare (M) e funzionale (F).

Le ovaie del gruppo H (N=12) nei tre differenti tempi sperimentali di conservazione a 4°C a 3h(n= 4 ; 2 gruppo sperimentale e 2 gruppo controllo), a 24 h (n= 4 ; 2 gruppo sperimentale e 2 gruppo controllo) e a 48h(n= 4 -2 gruppo sperimentale e 2 gruppo controllo) metà porzione con l'aggiunta di SOD e metà senza, sono state fissate in formalina per valutare tramite analisi istologica i danni tissutali.

Solo due ovaie sono state utilizzate per immunolocalizzare col peptide leader (SOD) per verificare l'adsorbimento della nuova isoforma rMnSoD nelle differenti cellule ovariche.

Le ovaie del gruppo M (N = 18) nei tre differenti tempi sperimentali di conservazione a 4°C (stoccati a 3h n=6, 3 sperimentali e 3 controllo; 24 h n=6, 3 sperimentali e 3 controllo; 48h n=6, 3 sperimentali e 3 controllo) sono stati stoccati a -80°C prima di effettuare l'analisi PCR al fine di rilevare l'attivazione/inattivazione rispettivamente del gene pro-apoptotico Bax e anti -apoptotico Bcl2.

Le ovaie del gruppo F (N =58) nei tre differenti tempi sperimentali di conservazione a 4°C (3h, 24 h e 48h; metà porzione con l'aggiunta di SOD e metà senza) sono stati dissezionati con una lama da bisturi per raccogliere i complessi cumulo-ovocitari (COC) in parte per la valutazione della loro vitalità (N =12, 4 ovaia per ogni tempo sperimentale di cui 2 ovaia trattate con SOD e 2 senza SOD) ed i restanti (N =46, 12 ovaia per ogni tempo sperimentale di cui 6 ovaia trattate con SOD e 6 senza SOD) per la valutazione dalla capacità di sviluppo in vitro.

2.4.3 RACCOLTA OOCITI

Le ovaie sono state dissezionate con una lama da bisturi in una piastra Petri da 35 x 0.7 mm , lavate con il fluido tubarico HEPES sintetico (HSOF) e raccolti così i complessi cumulo-oofo (COC). I COC sono stati lavati tre volte con mezzo HSOF. Gli ovociti con grande diametro, ooplasma scuro, e completamente circondato da almeno uno strato di cellule del cumulo sono stati selezionati per la maturazione in vitro (Figure 1 e 2).

2.4.4 RACCOLTA DEL SEME, IVM, IVF, IVC

Gli oociti selezionati sono stati messi in coltura (25-50 oociti/ml) in fluido tubarico sintetico con aminoacidi e 6 mg/ml di BSA (SOFaaBSA) contenente 0,1 IU di ormone follicolo stimolante porcino 140 e ormone luteinizzante porcino (pFSH-LH; Pluset, Laboratorios Calier, Barcelona, Spain), con l'aggiunta di 25 ng/ml di EGF, 25 µl/ml di transferrina -sodio selenite (ITS) ed 1.2 mmol/l di L- cisteina e incubati a 38.5°C per 24

ore con CO₂ al 5% [25]. Dopo le 24 ore, è stata valutata la sopravvivenza degli stessi allo stereomicroscopio, scartando quelli che mostravano degenerazione citoplasmatica. Una volta maturati in vitro i complessi del cumulo-ooforo (COC), sono stati fecondati in vitro con spermatozoi epididimali freschi recuperati da epididimi post orchietomia, effettuate nella clinica della facoltà di Napoli da 12 gatti domestici di razza europea (*Felis catus*). Ogni complesso epididimo-testicolare così raccolto è stato immediatamente immerso in PBS Dulbecco con 0.0036% (w/v) Na-piruvato, 0.1% (w/v) glucosio, 0.0066% (w/v) Na benzilpenicillina, 0.01% (w/v) streptomicina solfato and 4 mg/mL BSA (fraction V, Sigma) in provette a 20-24°C trasportati in laboratorio entro 3 ore dall'espianto. Gli epididimi venivano separati dai testicoli ed i vasi ematici visibili separati per isolare l'epididimo stesso e il dotto deferente prossimale. La porzione caudale di ogni epididimo veniva posta in 1 ml di Tris extender (3,025% idrossimetilaminometano (Tris), 1,7% di acido citrico, 1,25% di fruttosio, 0,06% di sodio benzil-penicillina, 0,1% streptomicina solfato) in piastre Petri di 35x10 mm e dissezionate con lama da bisturi per rilasciare gli spermatozoi. Dopo 10 minuti di incubazione a 38° il tessuto epididimale veniva rimosso con pinze chirurgiche ed il mezzo raccolto in una provetta tipo Falcon per essere centrifugato a 700 g per 6 minuti. Veniva rimosso il surnatante e la concentrazione del pellet era valutata con un microscopio contrastografico a 400x usando la camera di Burkner. Successivamente i pellets erano risospesi in un adeguato volume di medium fresco IVF consistente in SOFaaBSA (6 mg/ml) per ottenere una concentrazione spermatica finale di 10×10^6 spz/ml. Gli spermi motili venivano selezionati attraverso un sistema di lavaggio eseguito in provette Falcon da 15 ml in un incubatore al 5% di CO₂ per 2 ore. Dopo l'incubazione veniva raccolto il surnatante, rivalutata la concentrazione ed il volume corretto in modo da ottenere un numero finale di 1×10^6 spz motili/ml mentre la soluzione era addizionata a 20 mg/ml di penicillina-ipotaurina-epinefrina (PHE) e 10mg/ml di eparina.

Per la fecondazione in vitro 30-40 COCs venivano trasferiti in piastre a 4 pozzetti (4 WD) contenenti 500 ml di sospensione per IVF e coltivati per 18 ore a 38,5° al 5% di CO₂, 5% di O₂ e 90% di N₂. Il clivaggio era stabilito a 176 dopo 24 ore di coltivazione in vitro e gli embrioni erano coltivati nello stesso mezzo addizionato col 10% di FBS fino al giorno 8. Il mezzo veniva ricambiato ogni 4 giorni.

2.4.5 IMMUNOISTOCHEMICA

Per la immunolocalizzazione le cellule sono state incubate con una diluizione 1:20 di anticorpi di pecora anti-MnSOD a 4°C durante la notte, seguita poi dall'incubazione con 10 nm di colloidal gold accoppiato con anticorpi di asino anti IgG di pecora per 2 ore a temperatura ambiente. Trattando i campioni con silver enhancer per 6 min (Sigma-Aldrich, Germania), sono stati rivelati i complessi anticorpali, che sono stati poi risciacquati in tiosolfato di sodio e acqua distillata e controcolorati con Mayer's haemalum solution. Questi campioni sono stati esaminati usando il Kontron Electronic Imaging Computer System KS300. L'Imaging è stata eseguita utilizzando un Kontron elettronico Progress 3008 telecamera (Mancini et al, 2008).

2.4.6 ANALISI PCR

Il possibile effetto antiapoptotico della rMnSOD era studiato mediante analisi PCR del gene BAX pro-apoptotico del gene Bcl2 antiapoptotico. L' RNA totale estratto dai campioni ovarici subiva il processo di trascrizione inversa ed erano amplificati mediante PCR analisi i cDNAs sia del gene BAX che del gene Bcl2.

2.4.7 ANALISI STATISTICA

I dati erano espressi come media \pm SEM ed i paragoni tra gruppi erano effettuati tramite ANOVA test. Significatività statistica era stabilita a $p < 0,05$.

CAPITOLO – 3 RISULTATI

3.1.1 FASE SPERIMENTALE 1-PARTE I

Sono stati raccolti eiaculati da sedici stalloni con un totale di ottanta campioni di seme. Gli eiaculati di 5 stalloni non differivano per fertilità dopo 24 ore di stoccaggio. La concentrazione dei campioni oscillava da 150 a 193 milioni(10^6) /ml (media \pm SD: $173 \pm 8.4 \times 10^6$ /ml) mentre la motilità lineare al momento della raccolta oscillava dal 57 al 78% (media \pm : 73 ± 6.3 %). La Media \pm SEM per la motilità progressiva e la vitalità degli spermatozoi di stallone freschi e refrigerati delle 5 differenti aliquote testate ai tre differenti tempi è mostrata rispettivamente nelle Tabelle 1a e 1b.

Tabella 1a

Motilità progressiva delle cinque aliquote di spermatozoi testate ai quattro differenti tempi sperimentali (3h, 24h, 48h, 72h).

Motilità	3h	24h	48h	72h
Native semen (Controllo 1)	70 \pm 6,8	35 \pm 6,3 ^{A C}	20 \pm 6,2 ^{A C}	5 \pm 6,4 ^{A C}
Extended semen (Controllo 2)	68 \pm 3,4	60 \pm 2,5 ^{A D}	40 \pm 6,6 ^{A D}	36 \pm 3,2 ^{A D}
Extended pellet (Controllo 3)	74 \pm 7,9	63 \pm 2,1 ^{A D}	45 \pm 3,1 ^{A D}	35 \pm 2,1 ^{A D}
SOD 25UI (Sperimentale 1)	72 \pm 5,3	70 \pm 4,6 ^B	62 \pm 2,7 ^B	47 \pm 2,9 ^B
SOD 50UI (Sperimentale 2)	75 \pm 2,6	70 \pm 5,2 ^B	60 \pm 2,5 ^B	45 \pm 1,8 ^B
A-B, C-D p< 0,01 (colonna)				

Tabella 1b

Vitalità delle cinque aliquote di spermatozoi testate ai quattro differenti tempi sperimentali (3h, 24h, 48h, 72h).

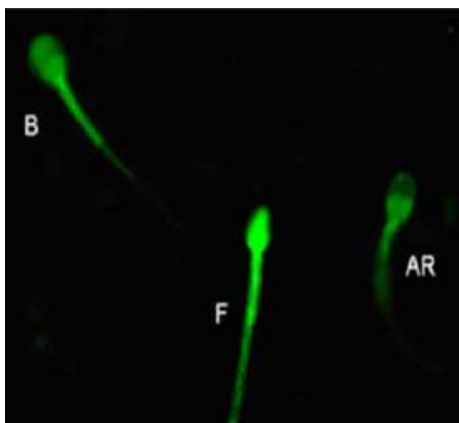
Vitalità	3h	24h	48h	72h
Native semen (Controllo 1)	81 \pm 5,2	47 \pm 2,4 ^{A C}	32 \pm 2,8 ^{A C}	15 \pm 3,4 ^{A C}
Extended semen (Controllo 2)	80 \pm 7,6	73 \pm 6,7 ^{A D}	54 \pm 4,2 ^{A D}	41 \pm 7,2 ^{A D}
Extended pellet (Controllo 3)	83 \pm 5,4	75 \pm 5,2 ^{A D}	58 \pm 2,9 ^{A D}	46 \pm 3,1 ^{A D}
SOD 25UI (Sperimentale 1)	82 \pm 7,6	81 \pm 3,6 ^B	75 \pm 3,4 ^B	58 \pm 7,2 ^B
SOD 50UI (Sperimentale 2)	82 \pm 2,5	79 \pm 4,9 ^B	73 \pm 2,6 ^B	55 \pm 6,7 ^B
A-B, C-D p< 0,001 (colonna)				

A 3 ore non c'erano significative differenze tra le aliquote, mentre a 24 ore la motilità dei gruppi sperimentali addizionati con SOD era significativamente più alta ($P < 0.01$) se

comparata con i controlli senza l'enzima (Tabella 1a). Simili indicazioni si avevano pure a 48 e 72 ore. Anche la vitalità risultava significativamente incrementata ($P < 0.001$) dall'aggiunta tanto di 25 quanto di 50 UI/ml di SOD al mestruo (Tabella 1b). Le differenze nella vitalità tra i campioni controllo e quelli sperimentali sono risultate significative in tutti e tre i tempi esaminati ($P < 0.001$).

I dati riguardanti l'integrità acrosomiale (AI e AR) usando la CTC (Figura 1, Tabella 2 e 3) e il metodo di colorazione PNA (Figura 2a e 2b) mostravano invece che l'aggiunta di SOD ai diluenti non comportava significative differenze ($P < 0.05$) tra i gruppi controllo 1-2-3 e quelli sperimentali 1-2. Significativamente più alta ($P < 0,01$) invece risultava la densità ottica della proteina ERK 1 fosforilata (p-ERK1, Fig. 3) nel controllo rispetto ai gruppi sperimentali stoccati a 3, 24 e 48 ore. L'analisi Western blot della proteina ERK fosforilata è mostrata nella Tabella 4. La densità ottica di p-ERK1, dopo 24 ore di conservazione, nel liquido seminale tal quale (controllo 1) e nel liquido seminale diluito con Kenney sperm extender (controllo 2) è stato $5,147 \pm 7.2 \pm 4,214 \pm 6.8$; al tempo zero non è stato possibile misurare la densità ottica di p-ERK1 in sperma trattato con SOD (esperimento 1 e 2).

Figura 1



Valutazione dello stato dell'acrosoma mediante metodica di colorazione con CTC: lo spermatozoo che mostra una intensa fluorescenza verde nella regione equatoriale della testa indica una reazione acrosomiale iniziale (B); in quello che presenta una zona equatoriale scura e una parte della regione acrosomiale verde si è avuta la reazione acrosomiale (AR); nello spermatozoo che presenta la testa priva di zone scure e appare di una fluorescenza intensamente e uniformemente verde brillante non si è avuta la reazione acrosomiale (F).

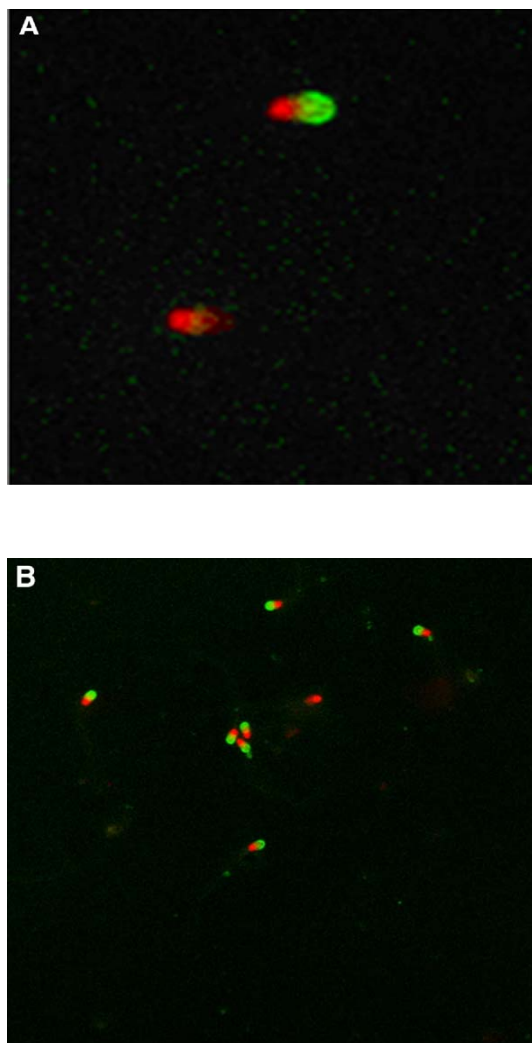


Figura 2.

Valutazione dello stato dell'acrosoma mediante metodica di colorazione FITC-PNA.

(A) Osservazione al microscopio confocale a ingrandimento 400 X: gli spermatozoi con fluorescenza verde presentano acrosoma intatto (AI) al contrario di quelli senza fluorescenza verde che presentano reazione acrosomiale (AR).

(B) Osservazione al microscopio confocale a ingrandimento 100 X: campione sperimentale 1 a 24 h di stoccaggio.

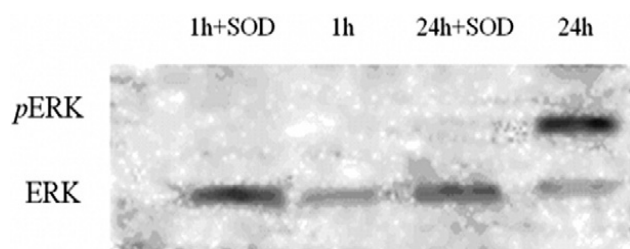


Figura 3.

Gel Western blot della proteina ERK (recettore extracellulare kinasi -dipendente) e della proteina fosforilata ai differenti tempi (1h e 24 h) di stoccaggio delle aliquote del controllo 3 e in quelle del gruppo Sperimentale 1 (\pm SOD).

Tabella 2

Mancata capacitazione e assenza di reazione acrosomiale in aliquote di spermatozoi (Media \pm SEM) freschi e refrigerati ai differenti tempi di sperimentazione mediante colorazione con CTC (F) e con colorazione Pisum sativum coniugato FTC (AI).

	Controllo 1 (% \pm SEM)		Controllo 2 (% \pm SEM)		Controllo 3 (% \pm SEM)		Sperimentale 1 (% \pm SEM)		Sperimentale 2 (% \pm SEM)	
	AI	F	AI	F	AI	F	AI	F	AI	F
3h	67,1 \pm 13,8	65,6 \pm 9,3	67,1 \pm 13,8	65,6 \pm 9,3	67,1 \pm 13,8	65,6 \pm 9,3	67,1 \pm 13,8	65,6 \pm 9,3	67,1 \pm 13,8	65,6 \pm 9,3
24h	48,5 \pm 12,1	47,2 \pm 1,9	50,5 \pm 10,2	51,2 \pm 3,2	49,3 \pm 8,4	48,9 \pm 1,7	55,1 \pm 11,7	54,7 \pm 8,3	56,2 \pm 8,6	54,9 \pm 2,4
48h	19,3 \pm 10,1	17,8 \pm 5,2	22,4 \pm 11,5	21,6 \pm 6,4	21,7 \pm 12,2	22,1 \pm 10,4	35,2 \pm 6,8	36 \pm 10,2	38,4 \pm 8,5	36,6 \pm 10,5
72h	12,6 \pm 12,3	11,4 \pm 11,6	15,6 \pm 6,8	14,6 \pm 6,8	20 \pm 10,4	19,5 \pm 9,6	24,2 \pm 6,4	3,9 \pm 8,5	28,4 \pm 3,2	26,9 \pm 10,2

Tabella 3

Capacitazione e reazione acrosomiale di aliquote di spermatozoi (Media \pm SEM) freschi e refrigerati ai differenti tempi di sperimentazione mediante colorazione con CTC (B-AR) e con colorazione Pisum sativum coniugato FTC (AR).

	Controllo 1 (% \pm SEM)		Controllo 2 (% \pm SEM)		Controllo 3 (% \pm SEM)		Sperimentale 1 (% \pm SEM)		Sperimentale 2 (% \pm SEM)	
	AR	B - AR	AR	B - AR	AR	B - AR	AR	B - AR	AR	B - AR
3h	8 \pm 6,1	9 \pm 4,3	8 \pm 6,1	9 \pm 4,3	8 \pm 6,1	9 \pm 4,3	8 \pm 6,1	9 \pm 4,3	8 \pm 6,1	9 \pm 4,3
24h	22,4 \pm 4,1	23,2 \pm 10,1	17,6 \pm 6,2	18,1 \pm 10,9	24,3 \pm 7,3	25,2 \pm 10,1	14,3 \pm 2,3	16 \pm 10,9	12,4 \pm 4,2	13,1 \pm 6,8
48h	49,16 \pm 12,4	46,5 \pm 3,4	40,16 \pm 14,7	42,2 \pm 5,3	42,16 \pm 12,4	43,9 \pm 7,6	37,6 \pm 11,5	39,4 \pm 5,7	34,1 \pm 12,8	36,2 \pm 9,1
72h	73,16 \pm 11,2	69,8 \pm 7,6	68,16 \pm 10,4	69,8 \pm 2,5	65,10 \pm 3,4	62,4 \pm 8,1	56,6 \pm 3,8	58,4 \pm 10,8	52,7 \pm 2,5	50,9 \pm 7,3

A 48 e 72 ore di stoccaggio, l'incubazione con SOD è stata associata ad una significativa ($P < 0,01$) riduzione della densità ottica di p-ERK1 rispetto al controllo (Tabella 4). L'analisi statistica ha mostrato una differenza significativa tra controllo e aliquote sperimentali a 24, 48 e 72 ore di stoccaggio. Questi dati hanno mostrato che i livelli di pERK1 aumentano quando i parametri di qualità dello sperma subiscono una significativa riduzione (Tabella 4).

Tabella 4

Valutazione Western blotting della fosforilazione della proteina ERK (recettore extracellulare kinasi-dipendente) quantificata mediante analisi densitometrica. I risultati sono espressi come densità ottica.

	3h		24h		48h		72h	
	ERK1	pERK1	ERK1	pERK1	ERK1	pERK1	ERK1	pERK1
Native semen (Controllo 1)	2896±15,2	0	2984±5,2	5147±7,2 ^A	3184±11,9	6147±18,3 ^A	2978±4,7	6256±16,5 ^A
Extended semen (Controllo 2)	3100±9,3	0	2947±13,5	4214±6,8 ^A	4105±8,6	4650±14,2 ^A	3911±5,4	4926 ±15,4 ^A
Extended pellet (Controllo 3)	2267±12,8	0	2443±12,9	4823±18, ^A	3621±5,9	5212±15,6 ^A	3621±5,2	5814±18,2 ^A
SOD 25UI (Sperimentale1)	2784±11,7	0	4452±15,6	0 ^B	4623±11,6	1680±13,6 ^B	4623±5,6	2412±11,9 ^B
SOD 50UI (Sperimentale 2)	2451±5,8	0	3556±13,6	0 ^B	3910±12,7	2341±9,2 ^B	3910±15,8	2841±12,3 ^B

A-B, C-D p< 0,01 (colonna)

3.1.2 FASE SPERIMENTALE 1- PARTE II

Sono stati raccolti 60 campioni da 4 stalloni. I parametri di fertilità degli eiaculati dei 4 donatori non differivano statisticamente a 24 ore di stoccaggio. La concentrazione oscillava tra 296 e 364 spz x 10⁶ ml mentre la motilità progressiva alla raccolta oscillava dal 54 % all' 83 %.

Motilità e vitalità sono mostrate nella tabella 1a e 1b rispettivamente. A 3 ore di stoccaggio non c'era nessuna differenza significativa tra i campioni per quanto riguarda i parametri di motilità. A 24 ore, l'incubazione con SOD era associata a notevole incremento della motilità quando comparata ai gruppi controllo. Simili risultati erano ottenuti anche a 48 e 72 ore di incubazione. Anche la vitalità (tabella 1b) era significativamente più elevata nei campioni addizionati con SOD.

I dati riguardanti la frammentazione del DNA ottenuti col TUNEL test sono mostrati nella tabella 2. Anche per questo parametro si poteva desumere un netto vantaggio dall'aggiunta dell'antiossidante ai campioni, i quali mostravano, una riduzione della percentuale di spermi con DNA frammentato.

Tabella 1a

Motilità progressiva delle cinque aliquote di spermatozoi testate ai quattro differenti tempi sperimentali (3h, 24h, 48h, 72h).

Motilità	3h	24h	48h	72h
Native semen (Controllo 1)	61±4,7	34 ± 5,3 ^{A C}	20±4,4 ^{A C}	4±4,3 ^{A C}
Extended semen (Controllo 2)	59±3,4	50 ± 2,5 ^{A D}	30 ± 6,8 ^{A D}	24± 2,2 ^{A D}
Extended pellet (Controllo 3)	73 ± 6,9	53 ± 1,0 ^{A D}	40± 1,9 ^{A D}	30 ± 1,1 ^{A D}
SOD 25UI (Sperimentale 1)	71 ± 4,2	66 ± 3,9 ^B	58 ± 2,9 ^B	43 ± 3,4 ^B
SOD 50UI (Sperimentale 2)	73 ± 3,3	66 ± 4,2 ^B	56 ± 1,8 ^B	39 ± 2,0 ^B

A-B, C-D p < 0,01 (colonna)

Tabella 1b

Vitalità delle cinque aliquote di spermatozoi testate ai quattro differenti tempi sperimentali (3h, 24h, 48h, 72h).

Vitalità	3h	24h	48h	72h
Native semen (Controllo 1)	85±5,3	49 ± 1,3 ^{A C}	29±2,7 ^{A C}	12±3,6 ^{A C}
Extended semen (Controllo 2)	84±6,4	77± 6,7 ^{A D}	57 ± 3,1 ^{A D}	43± 7,2 ^{A D}
Extended pellet (Controllo 3)	87±5,2	79 ± 4,2 ^{A D}	60 ± 1,7 ^{A D}	47 ± 1,1 ^{A D}
SOD 25UI (Sperimentale 1)	86±7,3	85 ± 3,9 ^B	79 ± 2,7 ^B	61 ± 6,1 ^B
SOD 50UI (Sperimentale 2)	86±2,8	83 ± 5,8 ^B	75 ± 2,6 ^B	57 ± 6,3 ^B

A-B, C-D p < 0,001 (colonna)

Tabella 2

Percentuali di frammentazione del DNA di spermatozoi ottenute con TUNEL test ai quattro differenti tempi sperimentali (3h, 24h, 48h, 72h).

	Controllo 1	Controllo2 (%± SEM)	Controllo 3 (%± SEM)	Sperimentale 1(%± SEM)	Sperimentale 2 (%± SEM)
	DNA frammentato (%)	DNA frammentato (%)	DNA frammentato (%)	DNA frammentato (%)	DNA frammentato (%)
3h	12	10	7	8	6
24h	30	25 A	13 B	11 B	12 B
48h	39	34 A	31 A	19 B	24 B
72h	54 A	46 A	42 A	25 B	30 B

A-B p < 0,001 riga

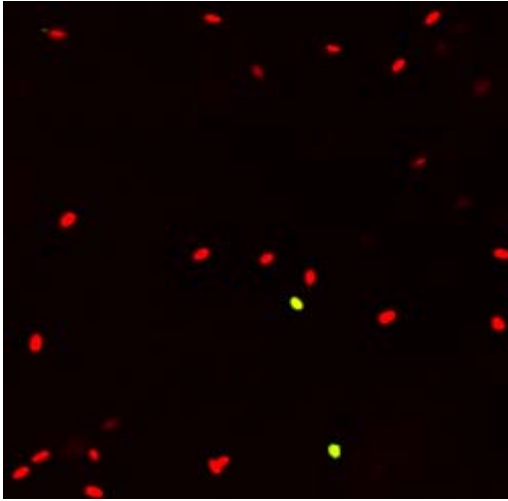


Figura 1 campione controllo a 3h senza SOD

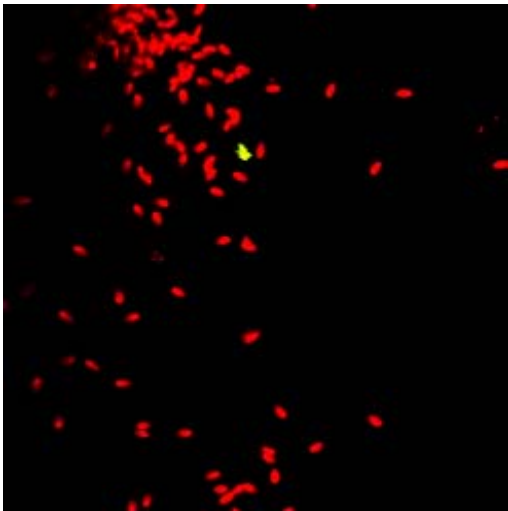


Figura 2 campione sperimentale con SOD (25 UI)

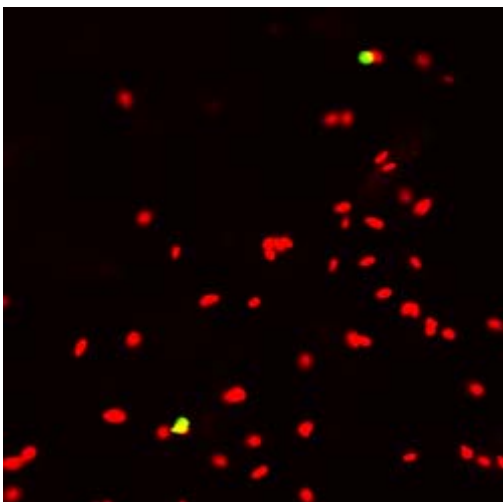


Figura 3 campione sperimentale con SOD (50UI)

3.2 FASE SPERIMENTALE 2

Sono stati raccolti 15 campioni da 5 cani. I parametri di fertilità degli eiaculati dei 5 donatori non differivano statisticamente a 24 ore di stoccaggio. La concentrazione oscillava tra $500-1000 \times 10^6$ spz/ml mentre la motilità progressiva alla raccolta oscillava dal 58 % all' 80 %.

Motilità e vitalità sono mostrate nella tabella 1 e 2 rispettivamente. Ad 1 ora di stoccaggio non c'era nessuna differenza significativa tra i campioni per quanto riguarda i parametri di motilità e vitalità. A 24 ore, l'incubazione con SOD risulta associata a notevole incremento dei parametri di motilità e vitalità quando comparata al gruppo controllo. Simili risultati sono stati ottenuti anche a 48 ore. A 72 ore di incubazione la motilità e vitalità spermatiche risultavano significativamente più elevate ($P < 0.005$) nei campioni addizionati con SOD.

Tabella 1

Motilità progressiva dei tre gruppi di spermatozoi testati ai tre differenti tempi sperimentali (1h, 24h, 48h, 72h).

Motilità	1h	24h	48h	72h
Senza SOD (controllo)	80±5,8	36±4,3 ^A	28±5,2 ^A	10±3,4 ^C
SOD 10UI (Sperimentale 1)	74 ± 2,7	66 ± 6,2 ^B	63 ± 2,8 ^B	42 ± 2,9 ^D
SOD 20UI (Sperimentale 2)	76 ± 3,1	64 ± 8,1 ^B	56 ± 2,6 ^B	44 ± 1,9 ^D

A-B $p < 0,001$ (colonna);

Tabella

Vitalità dei tre gruppi di spermatozoi testati ai quattro differenti tempi sperimentali (1h, 24h, 48h, 72h).

Vitalità	1h	24h	48h	72h
Senza SOD (Controllo)	83±3,3	43 ± 2,6 ^A	31±2,7 ^A	17±2,6 ^C
SOD 10UI (Sperimentale 1)	84±6,5	83 ± 3,4 ^B	77 ± 2,1 ^B	60 ± 5,2 ^D
SOD 20UI (Sperimentale 2)	84±2,6	81 ± 3,7 ^B	75 ± 2,2 ^B	58 ± 4,2 ^D

A-B $p < 0,001$ (colonna) ;C-D $p < 0,005$

3.3 FASE SPERIMENTALE 3

3.3.1 Test funzionale

I risultati della ripresa funzionale dei COC raccolti e conservati nei tre diversi tempi di stoccaggio a 4°C sono riassunti nella tabella 1. Nelle figure 1 e 2 sono mostrati COCs vitali e non vitali colorati con cFDA/Tripan Bleu .

I tassi di divisione sono stati simili nei gruppi stoccati a 3 e a 24 ore ($p > 0.05$), risultati significativamente più bassi invece si sono avuti per i gruppi stoccati a 48 ore ($p < 0.001$). Il tasso di divisione (tabella 2) risultava significativamente inferiore ($p < 0,05$) nei tre diversi tempi di stoccaggio nelle ovaie conservate con l'aggiunta di SOD . Il tasso di sviluppo nella fase di blastocisti diminuiva significativamente da 3 a 24 ore ($p < 0,05$) e a 48h ($p < 0,001$). A 48 h di stoccaggio non si è avuto nessuno sviluppo nella fase di blastocisti nelle ovaie stoccate senza SOD al contrario delle ovaie stoccate con SOD. Il tasso di sviluppo nella fase di blastocisti è stato significativamente più basso ($p < 0,05$) ai tre tempi di stoccaggio nelle ovaie conservate senza l'aggiunta di SOD nel mezzo di stoccaggio.

Tabella 1

Vitalità di oociti di gatto raccolti da ovaie stoccate con e senza SOD (F gruppo), colorazione cFDA/Tripan Bleu

COCs (gruppi)	COCs TOTALI	COCs VITALI	COCs NON-VITALI		
	N°	COCs Vitali N°	COCs Non-vitali N°	Cumuli Non-vitali N°	oociti Non-vitali N°
Freschi	50	93 A a	2	3	2
Stoccati a 3h	50	87	5	4	4
Stoccati a 24h	50	51 b c	8	36	5
Stoccati a 48h	50	32 B e	22	30	15
Stoccati a 3h + SOD	50	90	5	3	2
Stoccati a 24h +SOD	50	74 d	6	12	8
Stoccati a 48h +SOD	50	53 b f	24	14	9

A,B ($P < 0.01$); a,b – c,d – e,f ($P < 0.05$)

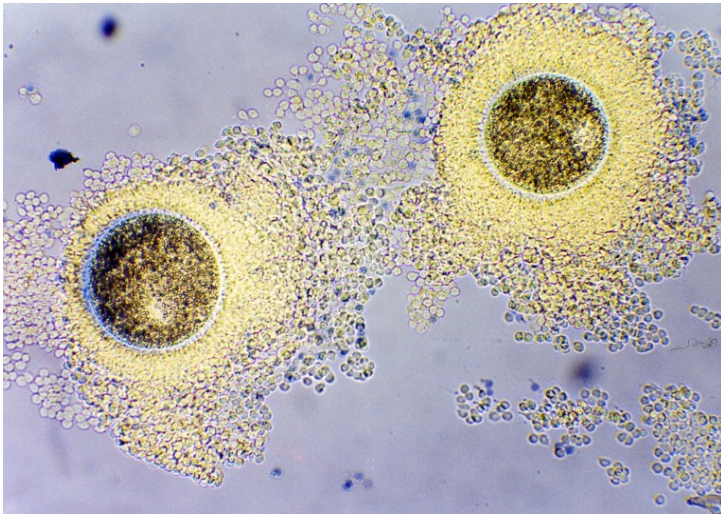


Figura 1
COCs colorati con cFDA/Trypan blue per valutare la vitalità: COCs vitali(400X).

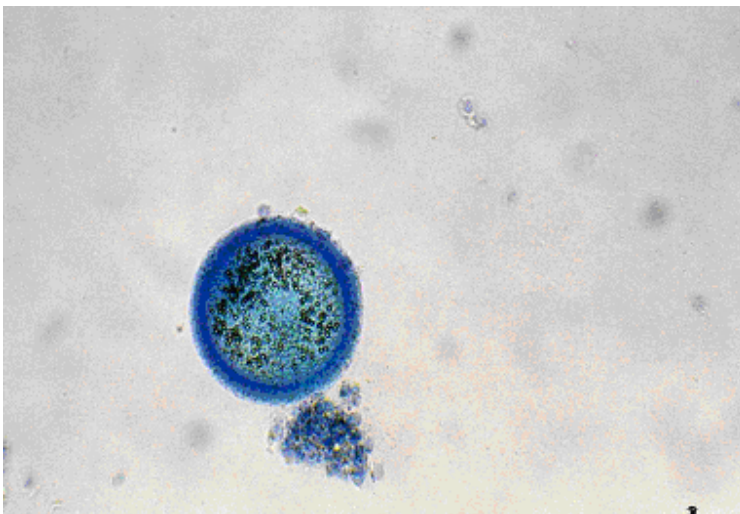
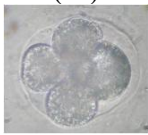
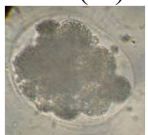
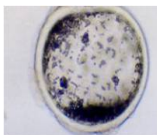


Figura 2
COCs colorati con cFDA/Trypan blue per valutare la vitalità: COCs non vitali (400X).

Tabella 2

Sviluppo embrionale di oociti di gatto raccolti da ovaie stoccate con e senza SOD (gruppo F).

COCs (gruppi)	N° COCs	Clivati (%) 	Morule N° (%) 	Blastocisti 	Clivati/ Blastocisti (%)
Freschi	250	193 (77.2) a A	108 (43.2) a A	62 (24.8) a A	()a A
Stoccati a 3h	100	68 (68)	45 (45)	22 (22)	()
Stoccati a 24h	100	47 (47) b c	31 (31) b	13 (13) b	()
Stoccati a 48h	100	24 (24) B e	10 (10) B c	0 (0) B c	()
Stoccati a 3h + SOD	100	65 (65)	48 (48)	26 (26)	()
Stoccati a 24h +SOD	100	63 (63) d	36 (38)	18 (18)	()
Stoccati a 48h +SOD	100	39 (39) b f	24(24) b d	7(7) b d	()

A,B (P< 0.01); a,b – c,d – e,f (P< 0.05)

3.3.2 Test immunoistochmico

Un' intensa colorazione citoplasmatica è stata chiaramente rilevata in tutte le cellule delle ovaie incubate con il peptide leader ma non nelle cellule della granulosa, a dimostrazione che il peptide marcato è stato in grado di permeare le cellule delle ovaie in queste condizioni ma non le cellule della granulosa confermando che l'assorbimento del peptide è stato inibito in presenza di estrogeni (A. Mancini et al.,2008) La colorazione non è stata osservata nelle cellule di controllo negativo trattate con il peptide (Fig 3 e 4).

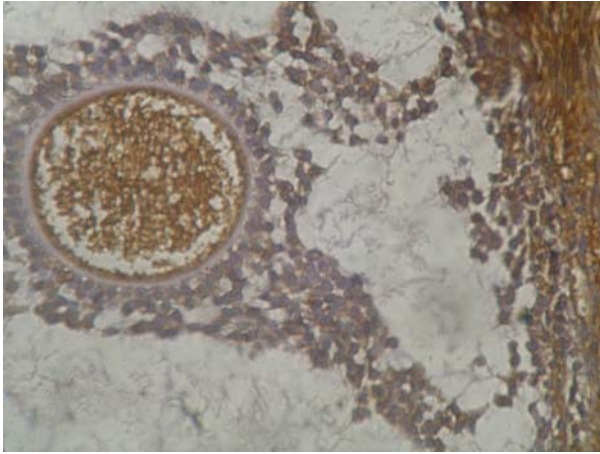


Figura 3
Analisi immunoistologica di tessuto ovarico. Ovaie stoccate a 4 ° C per 24 ore con rMnSOD. È evidente l'assorbimento enzimatico da parte dei follicoli (1000x).

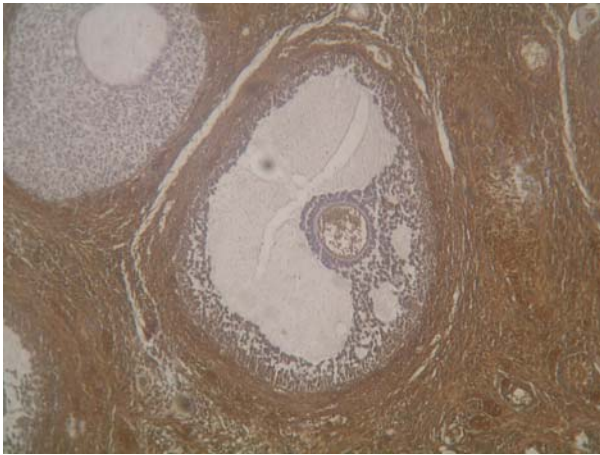


Figura 4
Stessa immagine della precedente a minor ingrandimento (400x).

3.3.3 Test molecolare

La figure 5 e 6 mostrano i frammenti amplificati del gene pro-apoptotico Bax (460 bp) e del gene anti-apoptotico Bcl2 (205 bp) nelle diverse condizioni sperimentali. Una intensa trascrizione del gene Bax è stata chiaramente rilevata in tutti i campioni in assenza di SOD (tabella 3) così come nei controlli. Al contrario, l'espressione genica di Bcl2 potrebbe essere rilevata solo nelle cellule delle ovaie in presenza di SOD (tabella 4). La trascrizione dell'actina (500 bp), resistente al trattamento con SOD, è stata utilizzata per il controllo.

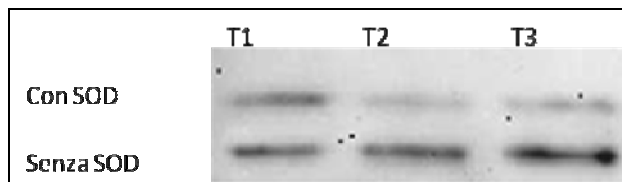


Figura 5
Analisi RT-PCR : frammenti amplificati del gene pro-apoptotico Bax

Tabella 3

Risultati dell'analisi PCR del gene pro-apoptotico Bax, quantificato come densità ottica.

Bax	T1	T2	T3
Con SOD	3450 A	3207 B *	2984 B *
Senza SOD	3580 A	3965 B **	4093 B **

A-B, * - ** p<0,01



Figura 6
Analisi PCR : frammenti amplificati del gene antiapoptotico Bcl2

Tabella 4

Risultati dell'analisi PCR del gene antiapoptotico Bcl2, quantificato come densità ottica.

Bcl2	T1	T2	T3
Con SOD	5062 A	3397 B	2178 B
Senza SOD	5128 A	3450 B	2231 B

A-B, * - ** p< 0,01

CAPITOLO 4 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

4.1.1 FASE SPERIMENTALE 1-PARTE I

In questo studio abbiamo determinato l'attività antiossidante di piccole concentrazioni di SOD addizionate al seme equino stoccato a 5° C su motilità, vitalità e fosforilazione della proteina ERK. Ci sono pochi studi in tal senso (Kankofer M et al., 2005) e già dalle esigue segnalazioni in umana (Ben Abdallah F et al., 2009; Tamuli M et al., 1994) si era potuto desumere un'azione benefica degli antiossidanti sui parametri spermatici durante lo stoccaggio a basse temperature. A causa della presenza di attività endogena SOD simile nel plasma seminale equino, nel nostro studio abbiamo deciso di utilizzare basse concentrazioni enzimatiche sia per rapportare i livelli a quanto conclamato in medicina umana, sia per ottenere concentrazioni comparabili ad integrazioni orali degli antiossidanti. Mentre in studi precedenti sembrava che la perossidazione lipidica fosse il principale fattore di impoverimento del materiale seminale equino (Kankofer M et al., 2005), nel nostro lavoro lo stoccaggio a 5°C non ha messo in evidenza differenze statistiche importanti a questo livello. Molto importante invece si è rivelato il livello di fosforilazione della proteina ERK, alla base di fenomeni imprescindibili come la capacitazione, la reazione acrosomiale e la fusione spermo-oocitaria.

Altra ipotesi fatta riguarda l'azione degli antiossidanti dopo l'ingresso degli spermatozoi all'interno delle vie genitali femminili, alla luce soprattutto del fatto che molte patologie uterine, come le endometriti, liberano alti livelli di radicali liberi che potrebbero essere adeguatamente smaltiti con l'uso appropriato di antiossidanti.

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che l'apporto di opportune integrazioni di SOD migliorano la qualità del materiale seminale equino stoccato a 5°C e che il principale deterioramento del seme equino è legato al fenomeno della fosforilazione delle ERK proteine che possono quindi essere utilizzate come indicatore predittivo di deterioramento spermatico. Ancora il nostro lavoro offre ulteriori informazioni per migliorare la produzione di mestruai per la conservazione dello sperma equino e consigliando ulteriori studi per implementare ancora le conoscenze riguardo alle integrazioni con antiossidanti e nel definirne precisamente le concentrazioni.

4.1.2 FASE SPERIMENTALE 1-PARTE 2

Nel precedente studio abbiamo mostrato come indirettamente i ROS depauperino la qualità dello sperma equino stoccato a 5 gradi e come l'aggiunta di SOD al mestruo abbia preservato gli spermatozoi dai danni indotti dai radicali liberi. I nostri dati ci hanno spinto ad ipotizzare che il principale bersaglio dei ROS nello sperma equino fossero le proteine ERK e che queste ultime potessero essere utilizzate per quantificare i livelli dei danni indotti dai ROS (Cocchia N et al., 2011). In questo studio abbiamo determinato l'attività antiossidante dell'aggiunta di SOD all'extender di seme equino stoccato normalmente a 5°C sulla vitalità e sulla motilità e soprattutto valutato il grado di frammentazione del DNA delle cellule spermatiche.

In uno studio Aitken J et al., (1994) ha dimostrato come lo stress ossidativo, e quindi l'azione dei ROS, sia in grado di indurre frammentazione del DNA: gli spermatozoi risultano essere particolarmente sensibili al danno al DNA, dato il loro scarso corredo enzimatico e antiossidante a fronte di un'alta capacità di generare ROS; questo comporta anomalie di motilità, vitalità e reazione acrosomiale (Aitken J et al., 1998). Il danno al DNA è stato collegato a una miriade di processi patologici come alterazioni dello sviluppo embrionale precoce, della vitalità e della mortalità perinatale (Aitken et al., 1999; Carrell et

al., 2003; Bungum et al., 2004; Seli et al., 2004; Virro et al., 2004; Lewis and Aitken, 2005; Aitken et al., 2009). I ROS inducono danni tanto al DNA nucleare quanto a quello mitocondriale con conseguente perdita di vitalità e motilità (Aitken et al., 1998); in una recente pubblicazione i ROS sono stati associati a danni al DNA negli spermatozoi umani (R. J. Aitken et al., 2010): la frammentazione del DNA era associata alla formazione dell'ossidrilite 8OhdG che può essere pertanto considerato un fattore di perossidazione e frammentazione nucleare.

Nel nostro studio abbiamo scelto il TUNEL test per valutare la frammentazione del DNA sia per la semplicità di esecuzione e sia per l'oggettività dei risultati ottenuti. Risultati da noi ottenuti che già in questo primo lavoro dimostrano in maniera diretta che l'aggiunta di SOD agli extender migliora i parametri di fertilità dello sperma equino e in maniera indiretta dimostra la riduzione dei danni arrecati dai ROS agli spermatozoi legati ad una diminuzione percentuale della frammentazione del DNA .

4.2 FASE SPERIMENTALE 2

In questo studio abbiamo determinato l'attività antiossidante di piccole concentrazioni di SOD addizionate al seme canino stoccato a 4° C su motilità e vitalità spermatiche. I nostri risultati suggeriscono che l'apporto di opportune integrazioni di SOD migliorano la qualità del materiale seminale canino stoccato a 4°C.

I promettenti risultati ottenuti in questo studio su seme refrigerato canino e quelli valutati su seme congelato equino stimolano senza dubbio ulteriori approfondimenti miranti a valutare l'utilizzo delle superOssido Dismutasi per migliorare la qualità di seme canino congelato/scongelato.

4.3 FASE SPERIMENTALE 3

Lo stoccaggio temporaneo delle ovaie è in grado di fornire l'opportunità di salvare ovociti da ovaie di felini in via di estinzione. Temperature adeguate per la conservazione ovarica con conseguente corretta maturazione degli ovociti dipendono dalle specie. È stato suggerito che temperature di stoccaggio elevate (23-38 °C) delle ovaie hanno un effetto negativo sulla competenza meiotica degli ovociti di gatto, e il periodo di conservazione delle ovaie in condizioni di caldo è limitata a 6 ore o meno per mantenere la competenza di sviluppo di ovociti. Naoi et al. (2007) e Otoi et al. (2001) hanno suggerito che a differenza di altre specie, gli ovociti di gatto hanno una capacità unica di maturare in vitro dopo lo stoccaggio delle ovaie per 24 ore a 4° C. Un lavoro molto recente (M. Evecen et al., 2009) suggerisce che l'estensione di questo periodo a 48 ore può causare un calo drammatico di questi risultati. Al contrario Wolf and Wildt (1996), riportano tassi inalterati durante l'IVM, quando le ovaie di gatto sono state conservate a 4° C fino a 72 ore. Inoltre, solo gli ovociti stoccati all'interno dell'ovaio per 24 ore sono in grado di produrre blastocisti dopo fecondazione in vitro (Wolf and Wildt, 1996). Inoltre è stato dimostrato, che i figli ottenuti da embrioni di gatto prodotti in vitro dopo il recupero dalle ovaie di ovociti conservati per 24-48 ore a 4°C sono perfettamente in grado di vivere (Pope et al., 2003). I nostri risultati confermano che gli ovociti di gatto domestico hanno la capacità di sviluppare in vitro dopo la conservazione ovarica a 4 °C per 24 ore, ma l'estensione di questo periodo di 48 ore può causare un calo drammatico di questi risultati: l'aggiunta di SOD nei media di stoccaggio migliora in modo significativo le competenze di sviluppo degli ovociti raccolti da ovaie stoccate per 24-48 ore. È stato suggerito che quando le ovaie di gatto sono conservate a 4 ° C, la degradazione del DNA ha inizio nelle cellule della granulosa, dopo 12 ore h (Jewgenow et al., 1997). È stato riportato che lo stoccaggio delle ovaie di gatto in soluzione salina a 4°C inibisce i cambiamenti tafonomici dopo 48 ore dall'escissione che si riflettono dalla presenza di una più intensa picnosi, da vacuolizzazione, e da una maggiore perdita di integrità della membrana delle cellule della granulosa e degli ovociti (Wood et

al., 1997). Il danno ossidativo derivante dalla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) ha dimostrato di portare alla morte cellulare causata da agenti tossici nelle ovaie di topo con conseguente atresia follicolare (R.K. Gupta et al., 2006). □ possibile che la conservazione delle ovaie asportate indurrebbe stress ossidativo con una conseguente alterazione della respirazione mitocondriale che andrebbe così a stimolare la produzione di ROS. Questa ipotesi è stata studiata nel nostro lavoro di analisi immunoistochimica e molecolare. I dati ottenuti confermano la correlazione tra lo stoccaggio e il danno ossidativo nelle cellule dell'ovaio e suggeriscono che l'aggiunta di SOD nei media di stoccaggio riducono questo danno.

Studi più approfonditi sono necessari per valutare e determinare i fattori presumibilmente specie-specifici in grado di garantire lo stoccaggio di ovaie di gatti per periodi prolungati.

4.4 Conclusioni generali

Le tre linee sperimentali sono state eseguite parallelamente ed in maniera indipendente pur nel rispetto del rigore scientifico imposto dalle esigenze di ricerca a ciascuna delle ipotesi avanzate e da confermare con gli studi di campo.

In tal senso i risultati ottenuti, pur nella diversità di forme e tempi diversi per i percorsi sperimentali seguiti, indicano chiaramente che l'utilizzo di antiossidanti ed in particolar modo di SuperOssido Dismutasi sia in forma commerciale (SOD Sigma) che ricombinante con manganese stechiometrico (rMnSOD) rappresentano un valido ausilio nella protezione gametica dai danni arrecati dalle basse temperature. In questa ottica i numeri ottenuti nel presente studio risultano ancora troppo esigui e richiedono importanti approfondimenti soprattutto per quello che riguarda il corretto dosaggio ed i tempi di somministrazioni delle integrazioni di cui sopra.

Sono ipotizzabili per il futuro ricerche combinate sui mestruai per la diluizione e la conservazione tanto degli spermatozoi quanto degli oociti, ma questo non esclude che studi

futuri possano riguardare metodiche di maturazione in vitro anche di embrioni prima delle procedure di trasferimento donatrici/riceventi.

CAPITOLO 5 – BIBLIOGRAFIA

Galli C, Olleoni S, Duchi R, Lagutina I, Lazzari G.2007. “Developmental competente of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranking from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer”. *Anim Reprod Sci*, 98:39-55.

Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirad MA. “Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes”. *Biol Reprod* 2002; 66:38-43.

Howard JG, Marinari PE, Wildt DE. “Black-footed ferret: Model for assisted reproductive technologies contributing to in situ conservation”. In: Holt WV, Pickard A, **Shelton, M.** 1995. “Harnessing the biological potential of sheep in providing protein for growing world population”. *J. Anim. Sci.* 73:243.

Swanson WF, Stoops MA, Magarey GM, et al. “Sperm cryopreservation in endangered felids: Developing linkage of in situ—ex situ populations”. In: Roldan E, Gomenido M, eds. *Spermatology*. Nottingham, England: Nottingham University Press; 2007:417-432.

Bó GA, Baruselli PS, Martinez MF. 2003. “Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle”. *Anim Reprod Sci*, 78:307-326.

Leibo SP, Loskutoff NM. “Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos”. *Theriogenology* 1993;39: 81–94.

Hassan H.M., Fridovich I. (1978): “Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli*”. *J. Biol.Chem.*, 253, 6445–6450.

M. Gomberg (1900): "An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl". *J. Am. Chem. Soc.* **22** (11): 757–771.

Nohl H, Jordan W, Hegner D (1981) :“ Identification of free hydroxyl radicals in respiring rat heart mitochondria by spin trapping with the nitron “*. DMPO. FEBS Lett* 123:241–244.

Agarwal A, Prabakaran SA. “Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology”. *Indian J Exp Biol* 2005; 43 : 963-74.

Del Rio, D., A.J. Stewart and N. Pellegrini (2005):” A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress”. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 15: 316-328.

Halliwell, B. (1996):”Antioxidants in human health and disease”. *Annual Review Nutrition* **16**, 33-50.

Tribble DL. “Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: Emphasis on vitamin C, vitamin E, and beta-carotene”. *Circulation.* 1999; 99: 591-595.

Halliwell B, Gutteridge JM. “Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy”. *Lancet.* 1984 Jun 23;1(8391):1396–1397.

Halliwell B and Gutteridge JMC 1990 “Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: An overview”; *Methods Enzymol.* 186 1-86

Kowaltowski AJ, Vercesi AE (1999):” Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress”. *Free Radic Biol Med* 26:463-471.

Gutteridge JMC. “Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage”. *Clin Chem* 1995; 41:1819-28.

Prior, R. and G. Cao (1999): ” Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering *in vivo* antioxidant status”. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 220: 255-261.

Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Davit-Spraul A., Conti M., Legrand A. (2000): “Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach”. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 3, 373|384.

Yu ZW, Quinn PJ. “Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology”. *Biosci Rep.* 1994 Dec;14(6):259-81. Review.

Hatchikian, E. C., and Y. A. Henry. 1977. “An iron containing SOD from the strict anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans*”. *Biochimie* 59:153-161

Dos Santos, W. G., Pacheco, I., Liu, M.-Y., Teixeira, M., Xavier, A. V. & LeGall, J. (2000). “Purification and characterization of an iron superoxide dismutase and a catalase from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*”. *J Bacteriol* 182, 769–804.

Meier B., Barra D., Bossa F., Calabrese L., Rotoli G. (1982): “Synthesis of either Fe- or Mn-superoxide dismutase with an apparently identical protein moiety by an anaerobic bacterium dependent on the metal supplied”. *J. Biol. Chem.*, 257, 13977–13980.

Gregory E.M., Dapper C.H. (1983):” Isolation of iron-containing superoxide dismutase from *Bacteroides fragilis*: reconstitution as a Mn-containing enzyme”. *Arch. Biochem. Biophys.*, 220, 293–300.

Bannister J.V., Bannister W.H., Rotilio G. (1987): “Aspects of the structure, function, and application of superoxide dismutase”. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22, 118–180.

Aitken RJ. “Molecular mechanisms regulating human sperm function”. *Mol Hum Reprod* 1997; 3 169-73.

Aitken RJ. “The Amoroso Lecture. The human spermatozoon - a cell in crisis?” *J Reprod Fertil* 1999; 115 : 1-7.

Gagnon C, Iwasaki A, De Lamirande E, Kovalski N.” Reactive oxygen species and human spermatozoa”. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 637 : 436-44.

Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. “Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature”. *Reprod Biomed Online* 2004; 8 : 616-27.

Griveau JF, Le Lannou D. “Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology”. *Int J Androl* 1997; 20 : 61-9.

Aitken RJ.” Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7 : 65-68.

Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, et al. “Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway”. *Development* 1995; 121 : 1139-50.

de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. “Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization”. *Mol Hum Reprod* 1997; 3 : 175-94.

Aitken RJ. “Molecular mechanisms regulating human sperm function”. *Mol Hum Reprod* 1997; 3 : 169-73.

de Lamirande E, Gagnon C. “Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process”. *Free Radic Biol Med* 1993; 14 : 157-66.

Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C. “Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization”. *J Androl* 1996; 17 : 151-7.

Agarwal A, Prabakaran SA.” Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology”. *Indian J Exp Biol* 2005; 43 : 963-74.

Sikka SC. “Relative impact of oxidative stress on male reproductive function”. *Curr Med Chem* 2001; 8 : 851-62.

Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B.” Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance”. *FEBS Lett* 1995; 369 : 131-5.

Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. "Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility". Asian J Androl 2004; 6 : 59-65.

Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. "Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function". J Androl 1996; 17 : 276-87.

Aitken RJ, Buckingham DW, West KM. "Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence". J Cell Physiol 1992; 151 : 466-77.

Gavella M, Lipovac V. "NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men". Arch Androl 1992; 28 : 135-41.

Aitken RJ, West KM. "Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients". Int J Androl 1990; 13 : 433-51.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. "Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility". J Histochem Cytochem 1982; 30 : 279-80.

World Health Organization (WHO). "WHO laboratory manual for the examination of human serum and sperm-cervical mucus interaction", 4th ed. Cambridge, UK: University Press; 1999.

Thomas J, Fishel SB, Hall JA, Green S, Newton TA, Thornton SJ. "Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology". Hum Reprod 1997; 12 : 2418-21.

Wolff H. "The biologic significance of white blood cells in semen". Fertil Steril 1995; 63 : 1143-57.

Tomlinson MJ, Barratt CL, Cooke ID. "Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility". *Fertil Steril* 1993; 60 : 1069-75.

Aitken J, Krausz C, Buckingham D. "Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions". *Mol Reprod Dev* 1994; 39 : 268-79.

Kartikeya Makker, Ashok Agarwal & Rakesh Sharma ."Oxidative stress & male infertility". *Indian J Med Res* 129, April 2009, pp 357-367 Review Article.

Plante M, de Lamirande E, Gagnon C. "Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility". *Fertil Steril* 1994; 62 : 387-93.

Shekarriz M, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. "Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen". *J Assist Reprod Genet* 1995; 12 : 70-4.

Ochsendorf FR. "Infections in the male genital tract and reactive oxygen species". *Hum Reprod Update* 1999; 5 : 399-420.

Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. "Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature". *Reprod Bio Med Online* 2004; 8 : 616-27.

Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. "The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity". *Hum Reprod* 1998; 13 : 1240-7.

Sies H. "Strategies of antioxidant defense". *Eur J Biochem* 1993; 215 : 213-9.

de Lamirande E, Gagnon C. "Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects". Hum Reprod 1995; 10 (Suppl 1: 15-21.

Aitken RJ. "Molecular mechanisms regulating human sperm function". Mol Hum Reprod 1997; 3 : 169-73.

de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. "Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization". Mol Hum Reprod 1997; 3 : 175-94.

Moor RM, Smith MW, Dawson MC. "Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers". Exp Cell Res 1980; 126:15–29.

Larsen WJ, Wert SE. "Role of cell junctions in gametogenesis and in early embryonic development. Tissue Cell 1988; 20:809–848.

Warnes GM, Moor RM, Johnson MH. "Changes in protein synthesis during maturation of sheep oocytes *in vivo* and *in vitro*". J Reprod Fertil 1977; 49:331–335.

Gruppen CG, Nagashima H, Nottle MB. "Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*". Biol Reprod 1995; 53:173–178.

Yamauchi N, Nagai T. "Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine". Biol Reprod 1999; 61:828–833.

Meister A. "Selective modification of glutathione metabolism". Science 1983; 220:472–477.

Ribarov SR, Benov LC. "Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation". Biochim Biophys Acta 1981; 640:721–726.

Nagao Y, Saeki MH and Kainuma H. (1994) "Effect of oxygen concentration and oviductal tissue on the development of *in vitro* matured e fertilized bovine oocytes cultured in protein free-medium. Theriogenology ,41,681-687.

- Nasr-Esfahani MH and Jonshon MH** (1992) “How does transferrin overcome the *in vitro* block to development of the mouse pre implantation embryo?” J. Reprod. Fertil.,96,41-48.
- Alvarez JG, Minaretzis D,Barrett CB et al.** (1996) “The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive technologies. Fertil. Steril.,65, 400-405.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ.** “Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis”. Cell 1993; 75:241–251.
- Murdoch WJ.”** Inhibition by oestradiol of oxidative stress-induced apoptosis in pig ovarian tissues”. J Reprod Fertil 1998; 114:127–130.
- Tarin JJ, Ten J, Vendrell FJ, Cano A.** “Dithiothreitol prevents ageassociated decrease in oocyte/conceptus viability in vitro”. Hum Reprod 1998; 13:381–386.
- Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al.** “Best practice policies for male infertility”. Fertil Steril 2002; 77 : 873-82).
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U.** “Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa”. Rev Reprod 1999; 4 : 31-7.
- Sakkas D, Mariethoz E, St John JC.** “Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway”. Exp Cell Res 1999; 251 : 350-5.
- Mitropoulos D, Deliconstantinos G, Zervas A, Villiotou V, Dimopoulos C, Stavrides J.** “Nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities in the spermatic vein of patients with varicocele: a potential role for nitric oxide and peroxynitrite in sperm dysfunction”. J Urol 1996; 156 : 1952-8.
- Romeo C, Ientile R, Santoro G, Impellizzeri P, Turiaco N, Impala P, et al.** “Nitric oxide production is increased in the spermatic veins of adolescents with left idiopathic varicocele.” J Pediatr Surg 2001; 36 : 389-93”.

Bréque C, Surai P, Brillard JP “Role of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro”. *Mol. Reprod. Dev.* 66: 314–323, 2003.

Bakst MR, Whishart G, Brillard JP. 1994. “Oviducal sperm selection, transport, and storage in poultry”. *Poult Sci Rev* 5:117–143.

Scott TW. 1973. “Lipid metabolism of spermatozoa”. *J Reprod Fertil, Suppl* 18:65–76.

Parks JE, Lynch DV. 1992.” Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes”. *Cryobiology* 29:255–266.

Surai PF, Blesbois E, Grasseau I, Chalah T, Brillard JP, Wishart GJ, Cerolini S, Sparks NH. 1998b. “Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen”. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 120:527–533.

Fujihara N, Howarth B, Jr. 1978. “Lipid peroxidation in fowl spermatozoa”. *Poult Sci* 57:1766–1768.

Cecil HC, Bakst MR. 1993.” In vitro lipid peroxidation of turkey spermatozoa”. *Poult Sci* 72:1370–1378.

Surai PF, Kutz E, Wishart GJ, Noble RC, Speake BK. 1997b. “The relationship between the dietary provision of alpha-tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: Effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation”. *J Reprod Fertil* 110:47–51.

Surai PF, Cerolini S, Wishart GJ, Speake BK, Noble RC, Sparks NHC. 1998c. “Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation”. *Poult Avian Biol Rev* 9:11–23.

Surai PF, Brillard JP, Speake BK, Blesbois E, Seigneurin F, Sparks NH. 2000a.” Phospholipid fatty acid composition, vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa”. *Theriogenology* 53:1025–1039.

Jones R, Mann T. 1973. "Proceedings: Formation of organic peroxides". J Reprod Fertil 35:590–591.

Alvarez JG, Storey BT. 1989. "Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation". Gamete Res 23:77–90.

Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. 1989. "Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility". Gamete Res 24:127–134.

De Lamirande E, Gagnon C. 1992. "Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes". J Androl 13:368–378.

Aitken RJ. 1994. "A free radical theory of male infertility". Reprod Fertil Dev 6:19–23 ; Discussion 23–14.

Wishart GJ. 1984. "Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilizing ability". J Reprod Fertil 71:113–118.

Fujihara N, Koga O. 1984. "Prevention of the production of lipid peroxide in rooster spermatozoa". Anim Reprod Sci 7:385–390.

Douard V, Hermier D, Blesbois E. 2000. "Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage". Biol Reprod 63:1450–1456.

Surai P, Cerolini S, Noble R, Speake B, Sparks NH, Cloughley J. 1997a. "Spermatozoa lipids: Protection from peroxidation by atocopherol. Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids" 57:263.

Surai PF. 2000b. "Organic selenium: Benefits to animals and humans, a biochemist's view". Proceedings of Alltech's 16th Annual Symposium: Biotechnology in the feed industry.

Froman DP, Howarth B. 1981. "Chicken and turkey spermatozoa superoxide dismutase: A comparative study". Biol Reprod 24:193–200.

- Jones R, Mann T.** 1977. "Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids". *J Reprod Fertil* 50:261–268.
- Dawara RK, Sharma OP, Makkar HP.** 1983. "Lipid peroxidation in bovine semen". *Int J Fert* 28:231–234.
- Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S.** 1991. "Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: Superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa". *Hum Reprod* 6:987–991.
- Castellini C, Lattaioli P, Moroni M, Minelli A.** 2000. "Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa". *Anim Reprod Sci* 63:275–282.
- Surai PF, Wishart GJ, Maldjian A, Noble RC, Sparks NH.** 1998d. "Lipid peroxidation in avian semen: Protective effect of seminal plasma". *Br Poult Sci* 39:S57–58.
- Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA.** "The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function". *Theriogenology* 2002; 58:1373–1384.
- Mazur P.** "Studies on rapidly frozen suspensions of yeast cells by differential thermal analysis and conductometry". *Biophys J* 1963; 3:323–353.
- Mazur P.** "Principles of Cryobiology". Boca Raton, FL: CRC Press; 2004: 2–65.
- Thuwanut P, Chatdarong K, Techakumphu M, Axner E.** "The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa". *Theriogenology* 2008; 70: 233–240.
- O'Flaherty C, Beconi M, Beorlegui N.** "Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozenthawed bull spermatozoa". *Andrologia* 1997; 29:269–275.
- de Lamirande E, Gagnon C.** "Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma". *Fertil Steril* 1993; 59:1291–1295.

Baumber J, Sabeur K, Vo A, Ball BA. “Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa”. *Theriogenology* 2003; 60:1239–1247.

Griveau JF, Renard P, Le Lannou D. “An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation”. *Int J Androl* 1994; 17: 300–307.

de Lamirande E, Lamothe G. “Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation”. *Free Radic Biol Med* 2009; 46:502–510.

de Lamirande E, Gagnon C. “A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa”. *Int J Androl* 1993; 16:21–25.

de Lamirande E, Gagnon C. “Reactive oxygen species (ROS) and reproduction”. *Adv Exp Med Biol* 1994; 366:185–197.

Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. “Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function”. *Biol Reprod* 1989; 41:183–197.

Aitken J, Krausz C, Buckingham D. “Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions”. *Mol Reprod Dev* 1994; 39:268–279.

Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW, Irvine DS. “Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma”. *Hum Reprod* 1995; 10:2061–2071

Michael A, Alexopoulos C, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Saratsis P, Boscios C. “Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa”. *Theriogenology* 2007; 68:204–212.

de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. “Reactive oxygen species and sperm physiology”. *Rev Reprod* 1997; 2:48–54.

Baker MA, Aitken RJ. “Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility”. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3:67.

Neild DM, Brouwers JF, Colenbrander B, Agüero A, Gadella BM. “Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa”. *Mol Reprod Dev* 2005; 72:230–238.

Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ Jr, Agarwal A. “Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index”. *Fertil Steril* 2004; 81:349–354.

Fraczek M, Kurpisz M. “The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa [in Polish]”. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2005; 59:523–534.

Lemkecher T, Dartigues S, Vaysse J, Kulski O, Barraud-Lange V, Gattegno L, Wolf JP. “Leucocytospermia, oxidative stress and male fertility: facts and hypotheses [in French]”. *Gynecol Obstet Fertil* 2005; 33: 2–1

Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H. “Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection”. *Int J Androl* 2003; 26:279–285.

Hammadeh ME, Radwan M, Al-Hasani S, Micu R, Rosenbaum P, Lorenz M, Schmidt W. “Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and nonpregnant patients after IVF/ICSI”. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 696–706.

England, G.C., Allen, W.E., Middleton, D.J., 1990. “An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate”. *Res. Vet. Sci.* 49, 66–70.

- de Lamirande, E., Gagnon, C., 1995.** “Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects”. *Hum. Reprod.* 10 (1), 15–21.
- Saleh, R.A., Agarwall, A., 2002.** “Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice”. *J.Androl.* 23, 737–752.
- Tselkas, K., Saratsis, P., Karagianidis, A., Samouilidis, S., 2000.** “Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed canine semen and their effects on some semen parameters”. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 107, 69–72.
- Menella, M.R., Jones, R., 1980.** “Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalyzed lipid-peroxidation reactions in semen”. *Biochem. J.* 191, 289–297.
- Aitken, R.J., Buckingham, D.W., Carreras, A., Irvine, D.S., 1996.** “Superoxide dismutase in human sperm suspensions:relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function”. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 495–504.
- Aitken, R.J., Krausz, C., Buckingham, D.W., 1994.** “Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions.” *Mol. Reprod. Dev.* 39, 268–279.
- Lasso, J.L., Noiles, E.E., Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1994.** “Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation”. *J. Androl.* 15, 255–265.
- de Lamirande, E., Gagnon, C., 1992.** “Reactive oxygen species and human spermatozoa II: depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility”. *J. Androl.* 13, 379–386.
- Bileski BHJ, Arudi RL, Sutherland MW.”** A study of the reactivity of H₂O₂/O₂ with unsaturated fatty acids”. *J Biol Chem* 1983;254:4759–61.

Pap EHW, Drummen GPC, Winter VJ, Kooij TWA, Rijken P, Wirtz KWA, Op den Kampf JAF, Hage WJ, Post JA. "Ratio fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY581/591". FEBS Letters 1999;453:278–28.

Ortega Ferrusola C, González Fernández L, García Macías B, Salazar Sandoval C, Morell JM, Rodríguez Martínez H, Tapia JA, Peña FJ. "Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa is stallion dependent and relates to "apoptosis like" changes". Reprod 2009;138:55– 63.

Peña FJ, Rodríguez Martínez H, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, Fernández González L, Macias García B. "Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review". Reprod Dom Anim 2009;44:345–9.

Rijlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. "Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction". Biol Reprod 2004;70:518 –22.

Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS. "A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterized by a redox regulated cAMP mediated induction of tyrosine phosphorylation". J Cell Sci 1998;111:645–56.

Lewis B, Aitken RJ. "A redox regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa". J Androl 2001;22:611–22.

Ecroyd H, Jones RC, Aitken RJ. "Endogenous redox activity in mouse spermatozoa and its role in regulating the tyrosine phosphorylation events associated with sperm capacitation". Biol Reprod 2003;69:347–54.

Neagu VR, Macías García B, Salazar Sandoval C, Morillo Rodriguez A, Ortega Ferrusola C, Tapia JA, Peña FJ. "Freezing dog semen in presence of the antioxidant Butylated hydroxitoluene improves post thaw sperm quality". Theriogenology 2010;73:645–50.

- Aurich JE, Schonherr U, Hoppe H, Aurich C.** “Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen”. *Theriogenology* 1997;48:185–192.
- Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D.** “Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa”. *J Reprod Fertil.* 1995;103:17–26.
- de Lamirande E, Gagnon C.** “Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes”. *J Androl.* 1992a;13:368–378.
- Baiardi G, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M, Ponce AA, Lacuara JL, Vincenti L.** “Differential effects of pharmacologically generated reactive oxygen species upon functional activity of epididymal mouse spermatozoa”. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997;75:17533–17538.
- Aitken RJ, Clarkson JS.** “Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa”. *J Reprod Fertil.* 1987;81:459–469.
- Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, Irvine S.** “Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine”. *Mol Reprod Dev.* 1997;47: 468–482.
- Ball BA, Vo AT, Baumber J.** “Reactive oxygen species generation by equine spermatozoa”. *Am J Vet Res.* 2001;62:5508–5515.
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W.** “A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay”. *Mol Human Reprod.* 1996;2:613–619.

Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. “Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients”. *Fertil Steril*. 1997;68:519–524.

Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. “Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection”. *Human Reprod*. 1998c;13:1864–1871.

Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. “Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma”. *Mol Human Reprod*. 1998a;4:439–445.

Potts RJ, Notarianni LJ, Jefferies TM. “Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation”. *Mut Res*. 2000;447: 249–256.

Ball BA, Gravance CG, Medina V, Baumber J, Liu IKM. “Catalase activity in equine semen”. *Am J Vet Res*. 2000;61:1026–1030.

Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. “The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation”. *J Androl*. 2001;21:895–902.

Ball BA, Vo AT. “Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591”. *J Androl*. 2002;23:259–269.

Linfor JJ, Meyers SA. “Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single cell gel electrophoresis”. *J Androl*. 2002;23:107–113.

Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. “The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity”. *Human Reprod*. 1998;13:1240–1247.

Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. “The effect of ascorbate and alphotocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa”. *Mutagenesis*. 1999;14:505–512.

Aitken RJ, Buckingham DW, West KM. “Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence”. *J Cell Phys*. 1992;151:466–477.

Ball BA, Vo AT, Baumber J. “Reactive oxygen species generation by equine spermatozoa”. *Am J Vet Res*. 2001;62:5508–5515.

Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demarex N, Krause KH. “A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen and lymph nodes”. *J Biol Chem*. 2001;276:37594–37601.

Aitken RJ, Clarkson JS, Fisher S. “Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function”. *Biol Reprod*. 1989;41: 183–197.

Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. “Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa”. *Mol Reprod Dev*. 1993b;35:302– 315.

Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D. “Relationship between iron-catalyzed lipid peroxidation potential and human sperm function”. *J Reprod Fertil*. 1993c;98:257–265.

Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, Van Duin M. “Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function”. *J Cell Sci*. 1995;108: 2017–2025.

Hyslop PA, Hindshaw DB, Schraufstatter IU, Sauerheber RD, Sklar LA, Spragg RG, Cochrane CG. “Intracellular calcium homeostasis during hydrogen peroxide injury to cultured P388D1 cells”. *J Cell Physiol*. 1986;129:356–366

Hyslop PA, Hindshaw DB, Halsey WA, Schraufstatter IU, Sauerheber RD, Spragg RG, Jackson JH, Cochrane CG. “Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The

glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide”. *J Biol Chem.* 1988;262:1665–1675.

Armstrong JS, Rajaskaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. “Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism”. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:869–880

de Lamirande E, Gagnon C. “Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes”. *J Androl.* 1992a;13:368–378.

Aitken RJ, Buckingham, D., Harkiss, D. “Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa”. *J Reprod Fertil.* 1993a; 97:441–450.

Luvoni, G.C. (2006). “Gamete cryopreservation in the domestic cat”. *Theriogenology* 66(1), 101-11.

Donoghue, A.M., Howard, J.G., Byers, A.P., Goodrowe, K.L., Bush, M., Blumer, E., Lukas, J., Stover, J., Snodgrass, K. & Wildt, D.E. (1992). “Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization in vitro in the cheetah (*Acinonyx jubatus*)”. *Biol Reprod* 46(6), 1047-56.

Watson, P.F. (2000). “The causes of reduced fertility with cryopreserved semen”. *Anim Reprod Sci* 60-61, 481-92.

Agarwal, A., Saleh, R.A. & Bedaiwy, M.A. (2003).” Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction”. *Fertil Steril* 79(4), 829-43.

Silva, P.F.N. (2006).” Physiology of peroxidation process in mammalian sperm”. PhD Thesis. Utrech University, Ridderprint, Ridderkerk, pp. 5-36.

Baumber J, Ball BA. “Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues”. *Am J Vet Res* 2005;

66:1415–9.

Tamuli M, Watson PF. “Use of simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm subpopulation”. *Anim Reprod Sci* 1994;35:247–54.

Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM.” A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles”. *Biol Reprod* 2003; 68:1828 – 35.

Borzacchiello G, Russo V, Spoleto C, Roperto S, Balcos L, Rizzo C, Venuti A and Roperto, F. “Bovine papilloma virus type-2 DNA and expression of E5 and E7 oncoproteins in vascular tumours of the urinary bladder in cattle”. *Cancer Lett* 2007;250:82–9.

Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. “The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation”. *J Androl* 2000;21:895–902.

Tamuli M, Watson PF. “Use of simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm subpopulation”. *Anim Reprod Sci* 1994;35:247–54.

Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol.* 1990 Mar;136(3):593-608;

Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA “The role of DNA fragmentation in apoptosis” *Trends in Cell Biology*, 5, 1, 21-26

Protocollo TUNEL- Am J Pathol 136, 593 (1990); *Trends Cell Biol* 5, 21 (1995)

Mitchell LA, De Iuliis GN, Aitken RJ. “The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology”. *Int J Androl* 2010 (in press).

R. John Aitken^{1,4,*}, Geoffry N. De Iuliis¹, Jane M. Finnie^{1,2}, Andrew Hedges², and Robert I. McLachlan^{3,5}. 2010 Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria *Human Reproduction*, Vol.25, No.10 pp. 2415–2426,

A. Mancini, A. Borrelli, A. Schiattarella, L. Aloj, M. Aurilio, F. Morelli, A. Pica, A. Occhiello, R. Lorizio, R. Mancini, A. Sica, L. Mazzaella, F. Sica, P. Grieco, E. Novellino, D. Pagnozzi, P. Pucci and J. Rommelaere. “Biophysical and biochemical characterization of a liposarcoma-derived recombinant MnSOD protein acting as an anticancer agent” *Int. J. Cancer*: 123, 2684–2695 (2008).

Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. “Activity of glutathione peroxidase, super oxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C”.

Theriogenology 2005;63:1354–65.

Ben Abdallah F, Dammak I, Attia H, Hentati B, Ammar-Keskes L.” Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in infertile men: correlation with semen parameter.” *J Clin Lab Animal* 2009;23:99 –104.

Cocchia N, Pasolini MP, Mancini R, Petrazzuolo O, Cristofaro I, Rosapane I, Sica A, Tortora G, Lorizio R, Paraggio G, Mancini A.” Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and erk (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa”. *Theriogenology* 75 (2011) 1201–1210).

Aitken J, Fisher H. “Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk”. *Bioessays* 1994;16:259–67.]. **Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS.**” Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa”. *Biol Reprod* 1998; 59:1037–1046.

Aitken RJ. “The Amoroso Lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis? “*J Reprod Fert* 1999;115:1–7. ;

Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B. Sperm “DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss”. *Arch Androl* 2003;49:49–55.

Bungum M, Humaidan P, Spano` M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. “The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI”. *Hum Reprod* 2004;19:1401–1408.;

Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. “Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization”. *Fertil Steril* 2004; 82:378–383.;

Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. “Sperm chromatin structure assay parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles”. *Fertil Steril* 2004;81: 1289–1295.

Lewis SE, Aitken RJ. “DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy”. *Cell Tissue Res* 2005;322:33–41.

- Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI.** “Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line”. *Int J Androl* 2009;32:46–56.
- Naoi, H., Otoi, T., Shimamura, T., Karja, N.W.K., Agung, B., Shimizu, R., Taniguchi, M., Nagai, T.,** 2007. “Developmental competence of cat oocytes from ovaries stored at various temperature for 24 h”. *J. Reprod. Dev.* 53, 271–277.
- Otoi, T., Murakami, M., Ooka, A., Karja, N.W.K., Suzuki, T.,** 2001.” Effect of size and storage temperature on meiotic competence of domestic cat oocytes”. *Vet. Rec.* 148, 116–118.
- Evecen M, Cirit U, Demir K, Karaman E, Hamzaoglu AI, Bakirer G.** “Developmental competence of domestic cat oocytes from ovaries stored at various durations at 4 °C temperature”. *Animal Reproduction Science* 116 (2009) 169–172.
- Wolf, B.A., Wildt, D.E.,** 1996. “Development of blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage”. *J. Reprod. Fertil.* 106, 135–141.
- Wolf, B.A., Wildt, D.E.,** 1996. “Development of blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage”. *J. Reprod. Fertil.* 106, 135–141.
- Pope, C.E., Gomez, M.C., King, A.L., Harris, R.F., Dresser, B.L.,** 2003. “Embryos produced in vitro after recovery of oocytes from cat ovaries stored at 4 °C for 24 to 28 h retain the competence to develop into live kittens after transfer to recipients”. *Theriogenology* 59, 308 (Abstract).
- Jewgenow, K., Wood, T.C., Wildt, D.E.,** 1997. “DNA degradation in mural granulosa cells of non and slightly atretic follicles of fresh and cold-stored domestic cat ovaries”. *Mol. Reprod. Dev.* 48, 350–355.

Wood, T., Montali, R.J., Wildt, D.E., 1997. “Follicle oocyte atresia and temporal taphonomy in cold stored domestic cat ovaries”. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 190–200.

R.K. Gupta, R.A. Schuh, G. Fiskum, J.A. Flaws. “Methoxychlor causes mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the mouse ovary”. *Toxicology and Applied Pharmacology* 216 2006 ,436–445).